



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

POTENCIAL IMUNOESTIMULATÓRIO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES LIBERADAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS
PELO *Mycobacterium bovis* BCG

ELISSANDRO MIRANDA MARTINS

Salvador – Bahia

2018

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

POTENCIAL IMUNOESTIMULATÓRIO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES LIBERADAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS
PELO *Mycobacterium bovis* BCG

ELISSANDRO MIRANDA MARTINS

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Dr^a. Theolis Costa Barbosa Bessa

Co-orientação: Dr^a. Tonya Azevedo Duarte

Salvador – Bahia

2018

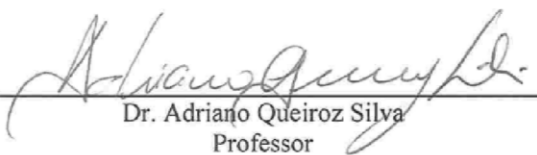
“POTENCIAL IMUNOESTIMULATÓRIO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS DE
MACRÓFAGOS INFECTADOS PELO MYCOBACTERIUM BOVIS BCG”.

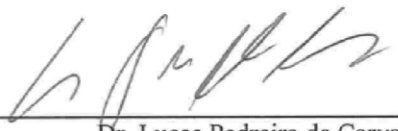
ELISSANDRO MIRANDA MARTINS

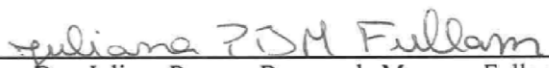
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 24 de setembro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Adriano Queiroz Silva
Professor
IGM/FIOCRUZ


Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ


Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CNPq

FAPESB

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tornou tudo isso possível e guiou os meus passos para que tudo desse certo.

A minha orientadora, Dra. Theolis e minha co-orientadora Dra. Tonya por terem confiado em mim, pela paciência, orientações, por me incentivar a ir atrás dos meus objetivos.

A minha família, por ter contribuído para a realização desse sonho. Em especial meus pais, José e Ana que foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui, eles que foram o combustível e a inspiração que me fizeram persistir e lutar para que tudo desse certo. Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos, primos e tios que sempre estiveram ao meu lado, me dando apoio e foram fundamentais nos momentos de lazer, que serviram para não me deixar desanimar.

A minha namorada Amanda, pela paciência e por todo o apoio e incentivo que me deu durante essa jornada.

Aos meus amigos Breno e Victor, que longe ou perto, de forma direta ou indireta, sempre estiveram ao meu lado. Ao meu amigo Silas, pela parceria desde a faculdade até a pós-graduação, pelos conselhos, resenhas e por não me deixar desanimar.

Aos meus colegas da pós-graduação, em especial Luciano, Helenita e Vanessa.

A todos do grupo TB, que me acolheram de braços abertos, por todo apoio e conhecimento passado, em especial Clarissa, Yasmim, Scarlet e Rita.

A toda a equipe do LIM1 e LET1, que fizeram o meu dia a dia mais alegre, pela amizade, parceria e conhecimento compartilhado. Em especial ao Paulo, Cascio, Renan, Luciano e Ivan.

Aos pesquisadores Dr. Diogo Moreira, Dr. Bruno Bezerril, Dra. Juliana Perrone, Dr. Leonardo Faria, Dr. Bruno Solano, Dr. Cláudio Pereira, Dra. Valéria Borges, Dra. Ana Cláudia Torrecilhas e Dra. Silvia Sardi que de maneira direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina investigativa e o IGM pela oportunidade e estrutura cedida.

A biblioteca, pela estrutura, apoio e orientações durante a execução desse trabalho.

Aos pesquisadores, estudantes de pós-graduação, iniciação científica, servidores, e terceirizados que de forma direta ou indireta contribuíram na execução do projeto.

Por fim, agradeço o apoio das agências de fomento, que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”

Theodore Roosevelt

MARTINS, Elissandro Miranda. Potencial imunostimulatório de vesículas extracelulares liberadas de macrófagos infectados pelo *Mycobacterium bovis* BCG. 2018. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Vesículas extracelulares (VE) são estruturas envolvidas por membrana fosfolipídica e proteica e podem conter componentes citoplasmáticos como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Elas são encontradas em fluidos biológicos como plasma, soro, saliva e leite materno e são liberadas por vários tipos celulares. As VE são consideradas importantes vias de comunicação intercelular, juntamente com fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, os quais são capazes de modular resposta imune. Estudos preliminares sugerem que as VE derivadas de macrófagos infectados exibem atividade pró-inflamatória e podem modular mecanismos da resposta imune, como a migração de outras células para o foco infeccioso. **OBJETIVO:** Avaliar a capacidade imunostimulatória e antimicobacteriana de VE derivadas de macrófagos infectados pelo *Mycobacterium bovis* BCG e do plasma de indivíduos saudáveis. **MÉTODOS:** VE foram isoladas a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos humanos infectados ou não por *M. bovis* BCG (VE-BCG, VE-meio), bem como, diretamente, a partir de plasma de doadores saudáveis (VE-plasma). As VE foram caracterizadas morfológicamente, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), quanto ao tamanho e a concentração por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e bioquimicamente, quanto à presença de moléculas de superfície e citocinas internas. A atividade antimicobacteriana e o potencial imunostimulatório das VE foi avaliado em culturas de macrófagos humanos infectados ou não pelo BCG, através da quantificação da carga bacilar intracelular por unidades formadoras de colônias (CFU) e dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF, respectivamente. **RESULTADOS:** A caracterização morfológica por MET, e quanto a tamanho e concentração por NTA, sugerem que as VE obtidas têm tamanho e formato compatíveis com achados de outros autores. Foi observada maior quantidade de VE/25 μ g de proteínas no plasma quando comparado com o sobrenadante de culturas estimuladas com BCG ou sem estímulo. A origem e a capacidade de apresentar antígenos foi confirmada respectivamente pela presença de moléculas de superfície de macrófagos (CD68) e a presença de receptores do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) em VE. VE-BCG mostraram carregar níveis aumentados de IL-6 e IL8 quando comparadas com VE-meio e VE-plasma. A atividade antimicobacteriana de VE-BCG e VE-Plasma foi sugerida pela redução da carga bacilar intracelular dos macrófagos tratados com essas respectivas VE. No entanto, não observamos mudança no perfil de liberação de citocinas no sobrenadante de culturas de macrófagos tratados com VE. **CONCLUSÃO:** Concluímos que macrófagos liberam VE com características da célula originária e com capacidade de apresentação de antígenos. Esses macrófagos quando infectados pelo BCG liberam VE carreadoras de citocinas pró-inflamatórias que podem favorecer a atividade antimicobacteriana do macrófago após a infecção pelo BCG.

Palavras chave: Bacilo Calmette-Guérin; Imunomodulação; Tuberculose; Vesículas extracelulares.

MARTINS, Elissandro Miranda. The Immunostimulatory potential of extracellular vesicles released from macrophages infected by *Mycobacterium bovis* BCG. 2018. 61 f. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Instituto Gonçalo Moniz, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Extracellular vesicles (VE) are structures surrounded by phospholipid and protein membrane and may contain cytoplasmic components such as proteins, enzymes and nucleic acids. They are found in biological fluids such as plasma, serum, saliva and breast milk and are released by various cell types. VE considered important intercellular communication pathways, along with growth factors, cytokines, chemokines and adhesion molecules, which are capable of modulating immune response. Preliminary studies suggest that VE derived from infected macrophages exhibit pro-inflammatory activity and may modulate immune response mechanisms, such as the migration of other cells to the infectious focus. **OBJECTIVE:** To evaluate the immunostimulatory and antimycobacterial capacity of VE derived from macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG and the plasma of healthy individuals. **METHODS:** VE were isolated from the culture supernatant of human macrophages infected or not by *M. bovis* BCG (VE-BCG, VE-medium) as well as directly from plasma from healthy donors (VE-plasma). The VE characterized morphologically by transmission electron microscopy (TEM), in size and concentration by nanoparticle tracing analysis (NTA) and biochemically, in the presence of surface molecules and internal cytokines. The antimicrobial activity and the immunostimulatory potential of the VE were evaluated in cultures of human macrophages infected or not by BCG, by quantifying the intracellular bacillary load by colony forming units (CFU) and cytokines IL-1 β , IL-6, IL -8, IL-10 and TNF, respectively. **RESULTS:** The morphological characterization by MET, and its size and concentration by NTA, suggest that the obtained VE have size and shape compatible with findings of other authors. A greater amount of VE/25 μ g of plasma proteins observed when compared to the supernatant of cultures stimulated with BCG or without stimulation. The origin and ability to present antigens confirmed respectively by the presence of macrophage surface molecules (CD-68) and the presence of type II major histocompatibility complex (MHC-II) receptors in VE. VE-BCG cells showed increased IL-6 and IL-8 levels when compared to VE-media and VE-plasma. The antimycobacterial activity of VE-BCG and VE-Plasma suggested by the reduction of the intracellular bacillary load of the macrophages treated with these respective VE. However, we did not observe a change in the cytokine release profile in the supernatant of VE-treated macrophages cultures. **CONCLUSION:** We conclude that macrophages release VE with characteristics of the original cell and with antigen presentation capacity. These macrophages when infected by BCG release VE that carry proinflammatory cytokines that may favor macrophage antimycobacterial activity after BCG infection.

Keywords: Calmette-Guérin bacillus; Immunomodulation; Tuberculosis; Extracellular vesicles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida patogênico de MTB	19
Figura 2 - Biogênese de VE	21
Figura 3 - VE derivados de neutrófilos.	24
Figura 4 - Desenho do estudo.	26
Figura 5 - Concentração de inóculos gerados da BCG.	35
Figura 6 - Avaliação da viabilidade celular durante cinética experimental.	37
Figura 7 - Carga bacilar intracelular durante cinética experimental.....	38
Figura 8 - Caracterização morfológica de VE.....	40
Figura 9 - Análise quantitativa de VE por NTA.	41
Figura 10 - Distribuição das VE por tamanho.....	42
Figura 11 - Rastreamento de VE por NTA.....	43
Figura 12 - Citometria de fluxo de VE marcadas com Anexina V/PI.	44
Figura 13 - Citometria de fluxo de marcadas com anti-CD68 e anti-HLA-DR.	45
Figura 14 - Dosagem de citocinas internas em VE	46
Figura 15 - Carga bacilar intracelular de BCG em macrófagos tratados com VE.....	47
Figura 16 - Quantificação de citocinas após tratamento com VE.....	48
Figura 17 - Viabilidade celular após o tratamento com VE.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dosagem de proteínas de VE por BCA.....	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Albumina, dextrose e catalase
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCA	Ácido bicinconínico
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CD	Células dendríticas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CFU	Unidades formadoras de colônias
CLR	Receptores de lectina do tipo c
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HEMOBA	Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon gama
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL	Interleucina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LTBI	Infecção latente por tuberculose
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
Macrófago SFM	Meio de cultura livre de soro específico para macrófagos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Taxa de infecção
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Células natural killer
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase

OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PI	Iodeto de propídio
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI completo	Rpmi-1640 suplementado com 10% de SBF inativado pelo calor e depletado de VE, 2mm de l-glutamina e 1% de antibióticos
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TB	Tuberculose
TGF β	Fator de crescimento transformador β
TLR	Receptor semelhante a <i>toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TSM	Tampão de seleção magnética
VE	Vesículas extracelulares
VE-BCG	Vesículas extracelulares liberadas de macrófagos infectados pelo BCG
VE-Meio	Vesículas extracelulares liberadas de macrófagos não infectados
VE-Plasma	Vesículas extracelulares obtidas do plasma de doadores saudáveis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE	15
2.2	AGENTE CAUSADOR DA TB	16
2.3	RESPOSTA IMUNE AO MTB.....	16
2.4	VESÍCULAS EXTRACELULARES	19
2.4.1	Relação VE e tuberculose.....	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	HIPÓTESE	25
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	DESENHO DO ESTUDO.....	26
5.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	27
5.3	CEPAS DE BCG.....	27
5.4	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS HUMANOS	27
5.5	INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS COM MICOBACTÉRIAS	29
5.6	AVALIAÇÃO DA CARGA BACILAR PELA ENUMERAÇÃO DE CFU	29
5.7	VIABILIDADE CELULAR PELA RESAZURINA	29
5.8	ISOLAMENTO DE VE A PARTIR DE MACRÓFAGOS HUMANOS E DO PLASMA	30
5.9	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	31
5.10	PADRONIZAÇÃO	31
5.11	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE VE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	32
5.12	QUANTIFICAÇÃO DE VE POR ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)	32
5.13	FENOTIPAGEM DAS VE	32
5.14	AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO INTERNO DE VE.....	33
5.15	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR BCG APÓS TRATAMENTO COM VE	33

5.16	AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOESTIMULADOR DE VE.....	33
5.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
6	RESULTADOS	35
6.1	OBTENÇÃO DO INÓCULO	35
6.2	PADRONIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE VE DE MACRÓFAGOS	35
6.2.1	Viabilidade Celular.....	36
6.2.2	Dosagem de proteínas em VE.....	37
6.2.3	Avaliação da carga bacteriana intracelular	38
6.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS VE	39
6.4	ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)	40
6.5	FENOTIPAGEM DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MACRÓFAGOS E DO PLASMA.....	43
6.5.1	Externalização da fosfatidilserina	43
6.5.2	Marcação de VE com anti-CD68 e anti-HLA-DR.....	44
6.6	AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO INTERNO DAS VE	46
6.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM VE.	47
6.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOESTIMULADOR DE VE.....	47
6.8.1	Avaliação da viabilidade celular após o tratamento com VE	49
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é considerada um grave problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de um terço da população mundial está infectada com o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), sendo a TB uma das principais causas de morbimortalidade no mundo (OMS, 2018).

Existe apenas uma vacina licenciada para TB no mundo, o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) que é derivado do *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) atenuado. No entanto, estudos têm alertado que esta vacina apresenta eficácia altamente variável para a proteção contra a TB pulmonar em adultos (FINE 1995; LIU *et al.*, 2009), o que justifica a necessidade de desenvolvimento de uma vacina mais segura e eficaz contra a TB. Nesse cenário, foi evidenciado o potencial das vesículas extracelulares (VE) como uma possível ferramenta no combate da TB. VE são vesículas de tamanho nanométrico produzidas tanto por células do hospedeiro quanto por microrganismos patogênicos e que estão envolvidas em muitas atividades, incluindo comunicação célula-célula, imunomodulação, virulência e sobrevivência celular (GUPTA e RODRIGUEZ, 2018).

Macrófagos infectados por microrganismos intracelulares como *Salmonella typhimurium* e *Toxoplasma gondii* induzem a produção de VE que podem modular respostas imunes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BHATNAGAR *et al.*, 2007). Por causa de suas capacidades imunoestimuladoras, VE estão sendo investigadas como componentes de futuras vacinas (BEAUVILLAIN *et al.*, 2007; CHAPUT *et al.*, 2004; DEL CACHO *et al.*, 2011; SCHNITZER *et al.*, 2010).

Nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou VE de macrófagos infectados com *L. amazonensis* (CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2014) e VE de neutrófilos infectados com MTB (DUARTE *et al.*, 2012).

VE liberadas de macrófagos infectados por micobactérias são contêm componentes micobacterianos, incluindo padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e podem estimular a produção de moléculas pró-inflamatórias em macrófagos receptores (BHATNAGAR *et al.*, 2007). Foi demonstrada a ativação da resposta imune adaptativa *in vitro* estimulada tanto por VE provenientes de

macrófagos infectados por MTB quanto por VE provenientes de macrófagos infectados por BCG (RAMACHANDRA *et al.*, 2010).

No entanto, ainda não está bem definido se VE são capazes de induzir proteção no hospedeiro contra uma infecção por micobactérias (CHENG e SCHOREY, 2013). Diante do que foi exposto, o presente estudo teve a finalidade de caracterizar as VE liberadas de macrófagos sem estímulo, infectados por BCG e do plasma de doadores saudáveis, bem como investigar se essas VE são capazes de estimular macrófagos a combater a infecção por BCG.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE

A TB é uma doença crônica, infectocontagiosa, responsável pelo maior número de mortes no mundo entre as doenças infecciosas causadas por um único agente. De acordo com a OMS, um terço da população mundial está infectada pelo MTB, agente causador da doença, portanto em risco de desenvolver a doença. Estima-se que tenham ocorrido no mundo em 2017 cerca de 10 milhões de casos novos de TB (OMS, 2018). Isso representa um aumento de 47% do número total de casos em comparação com a incidência estimada em 1990 (6,8 milhões de casos novos de TB) (OMS, 2018). Esse aumento está relacionado a questões sociais, como a pobreza e o baixo desenvolvimento socioeconômico (CARTER *et al.*, 2018; GERALDES SANTOS *et al.*, 2007) à epidemia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e ao aumento da incidência de infecções por cepas resistentes aos fármacos anti-TB (MORRIS *et al.*, 2013).

O Brasil está entre os 30 países responsáveis por 87% do número total de casos de TB no mundo (OMS, 2018). No país foram registrados cerca de 70 mil casos novos de TB em 2017 com o coeficiente de incidência de 33,5 casos para cada 100.000 habitantes. A Bahia foi o 5º estado em número de casos novos, enquanto Salvador foi a quarta capital em número de casos, com 4.099 casos registrados nesse mesmo ano e com cerca de 1,5 vezes o coeficiente de incidência nacional (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O BCG foi obtido por atenuação do *M. bovis* (CALMETTE, 1927). No mundo, mais de 90% dos recém-nascidos são vacinados com a BCG, única vacina atualmente licenciada contra o desenvolvimento da TB ativa (OMS, 2018). O uso da vacina revelou evitar formas graves de TB em crianças, no entanto, atualmente não existe vacina que seja eficaz na prevenção da tuberculose em adultos, antes ou depois exposição à infecção por TB (OMS, 2018). Sendo assim, é improvável que a BCG contribua substancialmente para o controle da epidemia da TB (ZWERLING *et al.*, 2011), o que justifica a necessidade de novas pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de uma vacina mais segura e eficaz contra a doença.

2.2. AGENTE CAUSADOR DA TB

O MTB, também conhecido como bacilo de Koch, é uma micobactéria, aeróbica em forma de bastonete, parasita intracelular e bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (CARROLL *et al.*, 2015). É propagado pelo ar, durante a tosse, espirro ou fala de indivíduos com a TB pulmonar ativa. Ao serem inalados por um indivíduo sadio, os bacilos infectam os macrófagos alveolares apresentando risco de desenvolver a doença (BAÑULS *et al.*, 2015) Caso o MTB não seja eliminado do hospedeiro, os indivíduos infectados podem apresentar a forma latente da TB (LTBI), que é assintomática e não transmissível, ou a doença TB ativa, que é transmissível e sintomática (PAI *et al.*, 2016). Na maioria dos indivíduos com LTBI, a imunidade é suficiente para manter a infecção controlada e assintomática através da formação do granuloma tuberculoso (cerca de 90% dos infectados), entretanto, por razões que ainda não foram completamente esclarecidas, cerca de 10% dos indivíduos com LTBI evoluem para a TB ativa (AHMAD, 2011).

2.3. RESPOSTA IMUNE AO MTB

Macrófagos são células fagocitárias que estão estrategicamente presentes em quase todos os tecidos do corpo, consistindo na primeira linha de defesa imunológica ao MTB. Iniciada a infecção por MTB, múltiplas vias celulares em macrófagos são ativadas para iniciar uma resposta imune adaptada ao patógeno invasor e também para regular os destinos celulares do hospedeiro. Os receptores Toll-like (TLR), por exemplo, expressos em macrófagos podem reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) em MTB e mediar a produção de citocinas imunorregulatórias, como TNF e interferon tipo I (IFN). Além disso, o receptor de vitamina D e a vitamina D-1-hidroxilase são regulados positivamente em macrófagos infectados por MTB, pelos quais a vitamina D participa de respostas imunes inatas. As vias de sinalização que envolvem TNF, IFN tipo I e vitamina D estão interconectadas, as quais desempenham papéis críticos na regulação da morte dos macrófagos infectados (XU *et al.*, 2014).

Os macrófagos desempenham um papel duplo durante a infecção por MTB. Por um lado, servem como principal hospedeiro da micobactéria, e por outro lado, eles têm um papel crucial na defesa imunológica (GUIRADO, SCHLESINGER e KAPLAN,

2013), pela secreção de enzimas proteolíticas com efeitos antimicrobianos e citocinas incluindo a Interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, TNF, IL-10 e TGF- β (fator de crescimento transformador- β) (HOSSAIN e NORAZMI, 2013). As citocinas TNF, IL-1 β e IL-6 secretadas pelos macrófagos são pró-inflamatórias, que em conjunto com quimiocinas, leucotrienos, prostaglandinas e complemento induzem uma maior permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias. Em contrapartida, as citocinas IL-10 e TGF- β também secretadas pelos macrófagos são anti-inflamatórias. Suas principais atividades dizem respeito à supressão da ativação de macrófagos e da produção de TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), bem como a diminuição da expressão do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) em macrófagos ativados, sendo portanto, potentes inibidores da apresentação de antígeno (ARANGO-DUQUE e DESCOTEAUX, 2014).

A literatura relata ainda que a liberação de IL-12 por macrófagos leva à produção de IFN- γ por células *Natural Killer* (NK) e diferenciação de células Th0 em células Th1, que também liberam IFN- γ (TRINCHIERI, 1995). IFN- γ é a principal molécula ativadora de macrófagos, sendo capaz de induzir o aumento da expressão de diversos genes no macrófago, induzir um aumento na expressão do MHC e de receptores para imunoglobulinas, recrutar linfócitos T que participam da destruição bacteriana, e estimular a produção de óxido nítrico. O IFN- γ , em sinergia com TNF, ativa macrófagos infectados, iniciando um importante mecanismo efetor da imunidade mediada por células (OTTENHOFF *et al.*, 1998; SALGAME, 2005).

A imunidade celular é o principal mecanismo de defesa contra o MTB, sendo realizada por intermédio do reconhecimento de antígenos por receptores em células da imunidade inata e adquirida. A imunidade contra o MTB é mediada especialmente por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ do tipo Th1 (FERRAZ *et al.*, 2006). Assim, de maneira geral pode-se inferir que a ativação do sistema imunológico e a inflamação são, sem dúvida, a chave principal na imunopatogenia da doença. No entanto, a complexidade das interações entre o MTB e os fatores hospedeiros dificulta o estabelecimento de biomarcadores relacionados à ativação da doença e proteção (LYADOVA e PANTELEEVA, 2015).

Durante a infecção por MTB, várias formas de destino celular foram observadas, como necroptose, apoptose e autofagia, entre as quais a apoptose e a autofagia têm sido reconhecidas como mecanismos de defesa inatos de macrófagos (BEHAR *et al.*, 2011; BRADFUTE *et al.*, 2013). A morte apoptótica reduz a viabilidade de diferentes espécies micobacterianas, incluindo o MTB. No entanto, cepas mais virulentas de MTB podem induzir altos níveis de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2, prevenindo a morte celular por apoptose e favorecendo a sobrevivência intracelular dos bacilos (RIOS-BARRERA *et al.*, 2006). A descoberta de que macrófagos infectados com MTB virulenta sofrem necroptose, enquanto aqueles infectados com cepas mutantes atenuadas de MTB sofrem apoptose, reforça que o MTB do tipo selvagem inibe ativamente a apoptose (XU *et al.*, 2014).

A formação do granuloma é um componente central da resposta inflamatória à infecção por MTB. Os leucócitos recém-recrutados agregados ao redor de macrófagos infectados proporcionam a microarquitetura do granuloma necessária para o controle da infecção. Inicialmente ocorre uma proliferação de macrófagos que fagocitam o agente. Após essa fase, essas células amadurecem e adquirem um padrão que se assemelha a uma célula epitelial chamada de célula epitelióide, podendo se fundir, dando origem às células gigantes multinucleadas - Células de Langerhans. Nesse sentido, o sistema imune tenta isolar a infecção prevenindo a disseminação do MTB e concentra, portanto a resposta no local de implantação da doença (Figura 1) (SANTOS e LIMA, 2017).

O granuloma é uma estrutura dinâmica e que pode apresentar três estados de equilíbrio. O primeiro consiste no granuloma protetivo, que desfavorece o crescimento da micobactéria, a presença das células T ativadas o granuloma torna-se totalmente organizado com a micobactéria no interior do macrófago circundado pelos linfócitos T, esse estado de equilíbrio é caracterizado por uma resposta imune mais intensa com a secreção de citocinas pró-inflamatórias, resultando na baixa capacidade da bactéria replicar e/ou sua eliminação no granuloma. O granuloma protetivo pode migrar para o granuloma homeostático, onde há um balanço da resposta imune, mediado por citocinas pró-inflamatórias *versus* citocinas anti-inflamatórias. Esse estado de equilíbrio pode então migrar para o granuloma protetivo ou evoluir para o granuloma transmissivo. O granuloma transmissivo é caracterizado pela dormência e infecção de neutrófilos, crescimento bacteriano, mediado pela supressão da imunidade,

desbalanço da resposta TH1 e TH2, superinfecção e hiperimunidade, nesse caso, a disseminação dos bacilos pode levar à tuberculose secundária, que é aquela quando ocorre a reativação dos bacilos que estavam contidos ou pode regredir ao granuloma homeostático ou protetivo (EHLERS e SCHAIBLE, 2013).

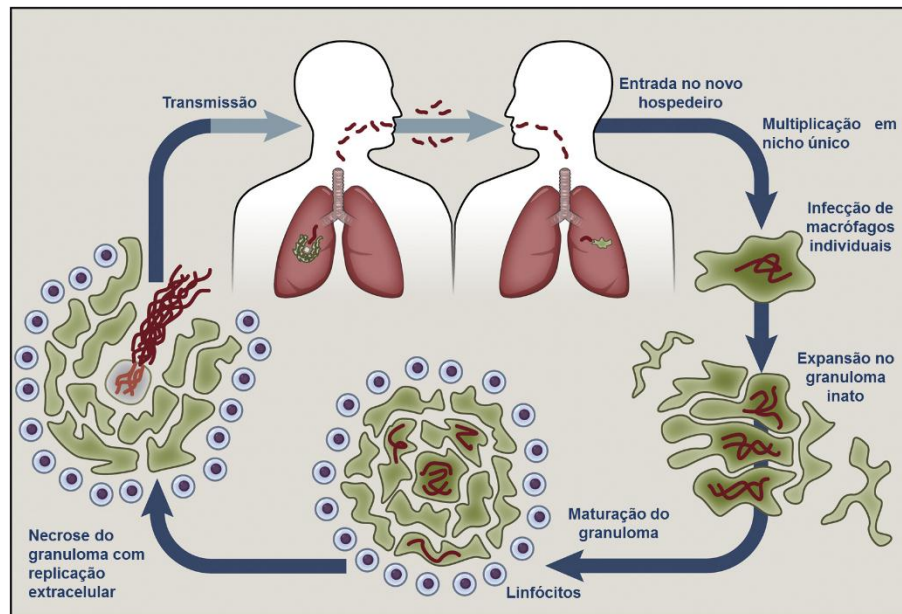


Figura 1 - Ciclo de vida patogênico de MTB

Um indivíduo com TB pulmonar expete aerossóis com MTB. Os bacilos quando inalados por um hospedeiro suscetível, são fagocitados por macrófagos alveolares. Em 90% dos casos, os hospedeiros imunocompetentes controlam a infecção primária e formam o granuloma, um agregado celular organizado contendo macrófagos e outras células imunes. O granuloma envolve o bacilo e controla sua proliferação. Entretanto, sob muitas circunstâncias, as células infectadas podem sofrer necrose, formando um granuloma com núcleo necrótico. Assim, indivíduos com infecção latente podem sofrer uma reativação da TB ao longo de suas vidas e tornar-se doentes capazes de transmitir a TB. Fonte: Adaptado de CAMBIER, FALKOW e RAMAKRISHNAN, 2014.

O recrutamento e retenção de células no interior do granuloma é um processo bem regulado e dependente da sinalização entre as células. Essa sinalização pode ocorrer através da secreção de fatores pró-inflamatórios das células infectadas, esses fatores incluem citocinas e quimiocinas e podem também incluir vesículas extracelulares (VE), como exossomos e ectossomos (WALTERS *et al.*, 2013).

2.4. VESÍCULAS EXTRACELULARES

VE foram observadas pela primeira vez em 1946 por Chargaff e West, que a descreveram como partículas derivadas de plaquetas pró-coagulantes em plasma (CHARGAFF e WEST, 1946). Com o avanço das pesquisas, as funções das VE foram

sendo mais elucidadas e caracterizadas. Atualmente já se sabe que elas podem ser isoladas a partir de quase todos os tipos de células e fluidos biológicos, tais como: urina (MERCHANT *et al.*, 2017), fluido nasal e de lavagem brônquica (TORREGROSA PAREDES *et al.*, 2012), saliva (IWAI *et al.*, 2017), fluido amniótico (KELLER *et al.*, 2011), plasma (CABY *et al.*, 2005; KARIMI *et al.*, 2018), soro (CHEN *et al.*, 2018), fluido seminal (POLIAKOV *et al.*, 2009; HÖÖG e LÖTVALL, 2015), entre outros.

Desde que foram descritas pela primeira vez, vários termos já foram utilizados para descrever as VE, como: “exossomos”, “ectossomos”, “vesículas semelhantes a exossomos”, “micropartículas”, “micro-vesículas”, “partículas ligadas à membrana”, “vesículas de membrana” “corpos apoptóticos”, “micropartículas apoptóticas”, entre outros (OROZCO e LEWIS, 2010).

Atualmente as VE são amplamente classificadas em 3 categorias principais: os corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos. Os corpos apoptóticos são considerados o maior grupo de VE, liberados como bolhas de células no processo de morte celular programada (apoptose), seu diâmetro varia de 1 a 4 μ m (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2013). As microvesículas possuem de 100nm a 1000nm de diâmetro, são liberados diretamente a partir da célula para o exterior através do brotamento da membrana plasmática. Os exossomos são as menores vesículas, possuem de 30 a 150nm de diâmetro, são formados através de brotamento para dentro das membranas endossomais, que dão origem a corpos multivesiculares intracelulares, em seguida fundem com a membrana plasmática, sendo liberadas para o exterior da célula (RUTTER e INNES, 2017; TKACH e THÉRY, 2016; TRIPISCIANO *et al.*, 2017; WHITESIDE, 2018; YANG e LI, 2018) (Figura 2). Nesse trabalho, o termo VE será utilizado para se referir a população mista de exossomos e microvesículas.

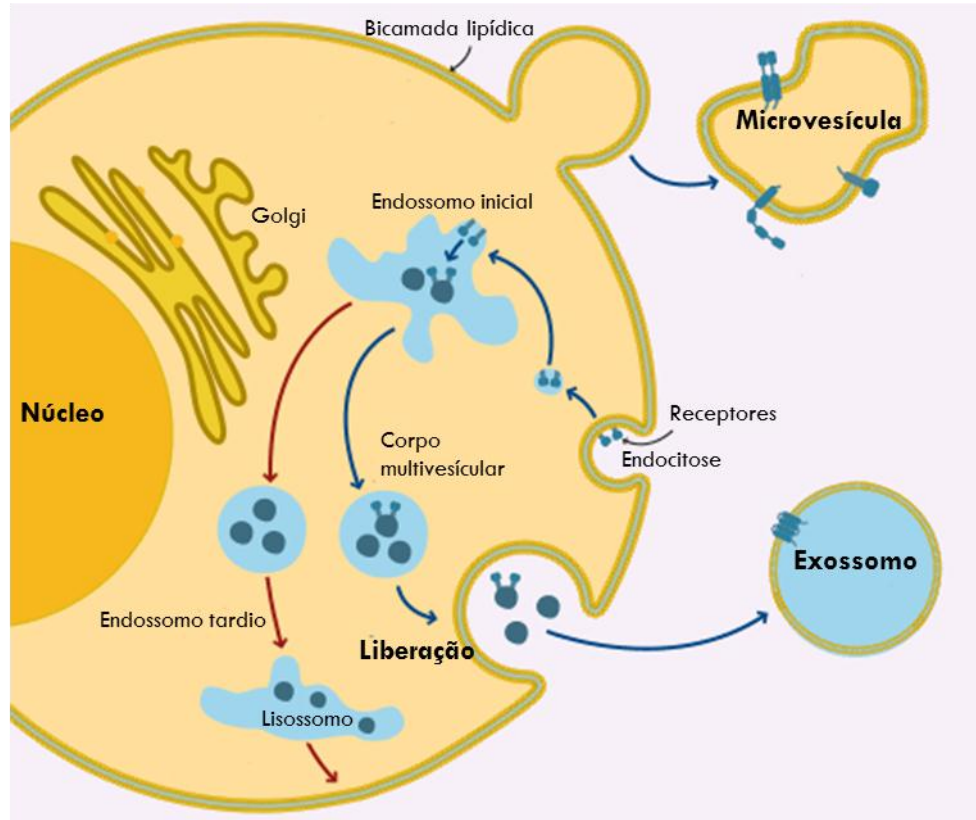


Figura 2 - Biogênese de VE

VE podem ser classificadas em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Exossomos e microvesículas são liberados por células saudáveis, embora diferem em vários aspectos. Exossomos são vesículas de tamanho nanométrico de origem endocítica que se formam a partir de tráfico vesicular intracelular. Seu tamanho varia de 30nm a 150nm. As microvesículas brotam da superfície da célula e seu tamanho pode variar entre 100nm a 1.000nm. Fonte: Adaptado de Abcam (“Extracellular vesicles: an introduction | Abcam”).

VE são consideradas uma das principais vias de comunicação intercelulares, em conjunto com fatores de crescimento, citocinas, nucleotídeos, lipídios, óxido nítrico e moléculas de adesão (CORRADO *et al.*, 2013). Elas são circundadas por uma membrana fosfolipídica e proteica que protege os componentes internos de degradação enzimática e viabiliza a criação de um ambiente natural estável (ENDERLE *et al.*, 2015).

VE contêm citoplasma e apresentam uma topologia de membrana que é inversa à membrana endossômica. O folheto interno da membrana de VE está voltado para o citoplasma, enquanto o folheto externo está contíguo ao espaço extracelular (SCHNEIDER e SIMONS, 2013). Esse processo ocorre durante a biogênese de VE, a assimetria lipídica da membrana é perdida, fazendo com que fosfatidilserina, um fosfolípido que está localizado exclusivamente no folheto interno seja exposto no

folheto externo (processo semelhante ao que ocorre durante a apoptose). A exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana é um sinal clássico que permite a captação pelas células fagocitárias (KOOIJMANS *et al.*, 2018)

A fusão das VE com a membrana plasmática de células receptoras permite a passagem de seus componentes internos para a célula-alvo e assim a transferência de informações. Dentre as informações transferidas estão: proteínas, enzimas, assim como moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). A capacidade de influenciar a expressão de genes em células distantes apresenta um modelo de sinalização célula-a-célula, oferecendo uma nova perspectiva sobre a comunicação intercelular com potenciais aplicações terapêuticas (RAMACHANDRAN e PALANISAMY, 2012).

Estudos da biogênese e função de VE podem levar à melhoria dos biomarcadores e candidatos a vacinas para uma série de doenças com opções terapêuticas limitadas atualmente. Dependendo da ancestralidade celular, VE carregam proteínas específicas do tipo celular que a originou, como o MHC quando liberado de células apresentadoras de antígeno, ou proteínas mielínicas, quando derivadas de oligodendrócitos (SCHNEIDER e SIMONS, 2013). Além disso, VE também podem carregar características do patógeno, VE facilitam a transferência do HIV-1 e constituintes virais de macrófagos infectados para células vizinhas, à medida que promovem a comunicação intercelular e, com condutas de ligação, regulam as respostas imunológicas e aceleram a disseminação viral (KADIU *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa isolou VE derivadas de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos, infectados ou não por *L. amazonensis* e mantidos em cultivo por um período de 9 dias. Nesse trabalho foi demonstrado que as VE derivadas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL1 β e TNF) em macrófagos *naive* e podem contribuir para modular o sistema imunológico a favor de uma resposta imune Th1 e conferir um fenótipo resistente ao macrófago para a eliminação da *Leishmania* (CRONEMBEG-ANDRADE, 2014).

2.4.1. Relação VE e tuberculose

VE liberadas por macrófagos alveolares infectados podem contribuir para a ruptura da monocamada das células epiteliais e para o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e CD para o local da infecção no alvéolo e, assim, facilitar a subsequente formação do granuloma. A produção continuada de VE de macrófagos infectados dentro do granuloma pode sinalizar a presença de infecção, estimulando a produção de TNF, que é essencial para a formação e manutenção do granuloma (BEAN *et al.*, 1999; FLYNN *et al.*, 1995; WALTERS *et al.*, 2013).

Células infectadas por MTB induzem maior liberação de VE do que a infecção por BCG, o que pode indicar que a virulência bacteriana também é um fator de modulação da liberação de VE. Além disso, VE de macrófagos infectados por MTB induzem maior recrutamento celular *in vivo*, com a participação de uma maior variedade de tipos celulares. Esse recrutamento pode estar relacionado a diferenças nos antígenos presentes nas VE, a expressão de diferentes ligantes de receptores celulares na superfície de VE, ou a variações no conteúdo de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas de VE (WALTERS *et al.*, 2013).

Confirmando esses achados, camundongos pré-tratados com VE de micobactérias patogênicas desenvolvem uma inflamação mais aguda e cargas bacterianas mais elevadas nos pulmões em comparação com camundongos controles e aqueles tratados com VE não patogênicas. A pré-exposição a VE também aumentou a disseminação de bacilos do pulmão para outros órgãos linfoides, como o baço. Esses dados sugerem que VE são prejudiciais para o hospedeiro durante a infecção por MTB (PRADOS-ROSALES *et al.*, 2011).

Nosso grupo de pesquisa isolou VE de neutrófilos infectados pelo MTB. Nesse estudo VE foram caracterizadas morfológicamente por MET (Figura 3) e usadas em ensaios de infecção, aonde macrófagos foram infectados com MTB e tratados com VE derivadas de neutrófilos por 96h e, após tratamento teve o número de unidades formadoras de colônias (CFU) determinado. A adição de VE reduziu a atividade antimicobacteriana dos macrófagos através do aumento da carga bacilar intracelular após o tratamento, indicando que as VE podem servir de veículo para regular a atividade antimicrobiana de macrófagos infectados com micobactérias (DUARTE *et al.*, 2012). Em contrapartida, um trabalho realizado por Alvarez-Jiménez e

colaboradores demonstrou que o tratamento com VE liberadas de neutrófilos reduziu a carga bacilar de MTB em macrófagos (ALVAREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2018).

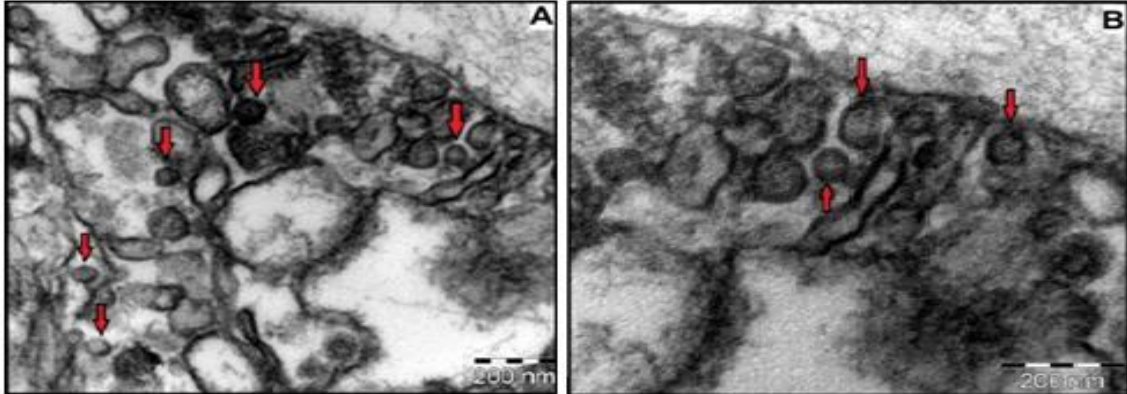


Figura 3 - VE derivados de neutrófilos.

Os neutrófilos humanos foram infectados por MTB e VE liberadas (setas) foram isoladas por ultracentrifugação e processadas para análise MET, duas horas após a infecção. Barra: 200 nm (DUARTE *et al.*, 2012).

VE de BCG adicionadas a macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos induzem a produção de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF, CXCL1 e MIP-1 α / CCL3, sendo a maioria destas citocinas induzidas de uma forma dependente de TLR2 (PRADOS-ROSALES, 2011), sugerindo que as VE possuem uma grande influência na resposta ao MTB.

Os trabalhos apresentados reforçam a ideia de que as VE possuem atividade na modulação da função antimicrobiana de macrófagos, no entanto ainda há muitas questões sem serem respondidas. Desta forma, ainda não está claro o papel protetor de VE derivadas de macrófagos infectados ou não pelo BCG e de VE isoladas do plasma de doadores saudáveis. O presente trabalho teve o objetivo de caracterizar melhor essas VE sobre a sua morfologia, composição, conteúdo e possível atividade de modular positivamente a resposta protetora contra a bactéria, a fim de servir de ferramenta para novas estratégias de estudo, principalmente para a produção de novos métodos diagnósticos ou vacinas contra a TB.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade imunoestimulatória e antimicobacteriana de vesículas extracelulares derivadas de macrófagos infectados por *Mycobacterium bovis* BCG.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar VE derivadas de macrófagos infectados pelo BCG, comparando-as com VE produzidas em culturas não infectadas e com VE obtidas do plasma humano;
- Avaliar o possível papel pró inflamatório de VE, por análise de moléculas de superfície e conteúdo intravesicular, incluindo citocinas;
- Avaliar o possível efeito imunoestimulador de VE sobre cultura de macrófagos infectados ou não pelo BCG;
- Avaliar a atividade antimicobacteriana de macrófagos infectados pelo BCG após tratamento com VE.

4. HIPÓTESE

O tratamento *in vitro* de macrófagos humanos derivados de monócitos com VE derivadas de macrófagos após a infecção com BCG é capaz de promover um efeito imunoestimulador e modular positivamente a atividade antimicobacteriana desses macrófagos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. DESENHO DO ESTUDO

O desenho do estudo está ilustrado na figura 4. VE de macrófagos foram obtidas de culturas de macrófagos diferenciados a partir de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis, purificados por *sorting* magnético e infectados ou não pelo BCG. O isolamento das VE liberadas de macrófagos foi avaliado em ensaio de cinética para definir o dia ideal de liberação das mesmas. VE foram isoladas também do plasma de doadores saudáveis. Após padronizar o dia ideal de liberação, as VE foram caracterizadas quanto à sua ultra-estrutura, tamanho e concentração bem como quanto à sua composição em relação a moléculas de superfície e intravesiculares. Adicionalmente, foram avaliados o seu possível efeito imunoestimulador e capacidade de modular a infecção, quando usadas para desafiar novas culturas de macrófagos. Para estes ensaios, foram testados os esquemas de tratamento sem infecção, em que as VE foram adicionadas nas culturas de células não infectadas, e de pós-infecção, em que houve exposição das culturas de macrófagos às VE e ao BCG. Por fim, foi avaliada a atividade antimicrobiana de macrófagos após tratamento com VE.

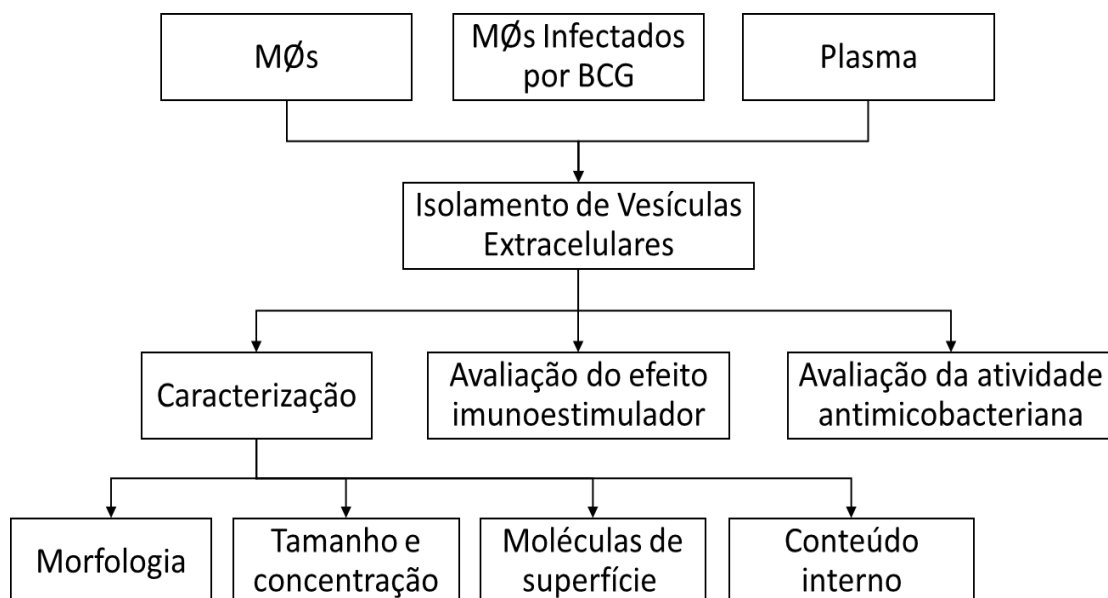


Figura 4 - Desenho do estudo.

Trata-se de um estudo de infecção experimental. Após preparo do inóculo BCG, macrófagos derivados de monócitos humanos foram infectados em um MOI 1:1 para obtenção de VE. Para avaliar VE presentes no plasma de doadores saudáveis, o sobrenadante foi ultracentrifugado. VE obtidas foram caracterizadas morfológicamente, bem como sua composição e conteúdo. Macrófagos infectados com BCG, MOI 10:1, foram tratados com VE e o efeito imunoestimulador e potencial antimicrobiano foram avaliados.

5.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto atual, inscrito no Sistema CEP-CONEP (Comitê de Ética em Pesquisa-Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) sob o certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE): 79081317.5.0000.0040, foi aprovado pelo CEP do Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz (CEP-IGM/FIOCRUZ).

5.3. CEPAS DE BCG

As cepas de *Mycobacterium bovis* BCG (Moreau-RJ) foram obtidas da coleção mantida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ (INCQS/FIOCRUZ/RJ).

As cepas liofilizadas foram reidratadas em meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de ADC (albumina, dextrose e catalase) e em seguida mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 15 dias. Após a incubação, suspensões homogêneas de micobactérias foram obtidas por *vortex* em tubo fechado com pérolas de vidro para desagregar as unidades bacterianas. O número total de bacilos na suspensão foi quantificado por CFU em crescimento em meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) mantido a 37°C em atmosfera aeróbica por 45 dias, as colônias foram quantificadas à medida que surgiam na superfície do meio 7H10.

As alíquotas quantificadas foram estocadas em meio 7H9 a 20% de glicerol a -80°C até o momento do uso.

5.4. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS HUMANOS

Os monócitos foram obtidos a partir de concentrados de leucócitos de *buffycoat* de doadores saudáveis, providos pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA).

A obtenção dos monócitos foi realizada por centrifugação diferencial utilizando Histopaque-1077. O concentrado de leucócitos era lavado duas vezes com salina estéril à temperatura ambiente. Após as lavagens, o concentrado de células foi diluído em salina estéril na proporção de 1:2, homogeneizado e submetido ao gradiente de histopaque-1077 (ficoll) sob centrifugação a 1500 rpm por 40 minutos a 25°C. O anel

de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) formado foi coletado e lavado duas vezes com salina estéril gelada.

Para a obtenção dos monócitos, PBMC foram incubados a 4°C por 30 minutos com microesferas de látex e hematita magnetizadas, recobertas com anticorpos anti-CD14 (marcador de monócitos e macrófagos). As células foram lavadas uma vez com 1mL de salina tamponada com fosfato degaseificada, contendo 1% de soro fetal bovino depletado de vesículas (tampão de seleção magnética, TSM). O *pellet* foi ressuspensão em 500 µl de TSM. Para a separação, foi utilizado um suporte metálico, colunas e ímãs próprios deste sistema. Foi utilizada uma coluna de separação magnética para cada 2-3 x 10⁸ células.

As colunas foram encaixadas no aparelho de seleção magnética e lavadas com TSM. Em seguida, foi aplicada a suspensão de células e antes de secar completamente foi lavada duas vezes com TSM. Após a segunda lavagem, a coluna foi removida do aparelho, foram adicionados 3mL de TSM e as células retidas foram removidas por pressão com um êmbolo estéril. As células separadas magneticamente foram lavadas uma vez com salina e quantificadas por azul de trypan utilizando câmara de Neubauer.

Os monócitos foram ressuspensos em meio de cultura à concentração de 2 x 10⁵ células/mL. As células foram plaqueadas para diferenciação em macrófagos em placas de 24 poços ou garrafas de cultura e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por sete dias na presença de 50ng/mL de M-CSF.

Durante a execução deste trabalho usamos dois tipos de meio de cultura para cultivo das células: o primeiro era o meio livre de soro específico para macrófagos (macrófago SFM) e o segundo era o meio RPMI-1640, o qual era suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado pelo calor e depletado de VE, 2mM de L-glutamina e 1% de antibióticos (RPMI completo). Para depletar as VE, o SBF foi submetido a processos semelhante aos utilizados para isolamento de VE, descrito mais à frente.

5.5. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS COM MICOBACTÉRIAS

Alíquotas quantificadas de BCG previamente estocadas foram mantidas *overnight* a -20°C e em seguida a 4°C por pelo menos 1 hora até completo descongelamento. Essas foram lavadas duas vezes com PBS 1x (salina tamponada com fosfato) para retirar o meio de congelamento, agregados celulares e possíveis VE liberadas pelo BCG. Os bacilos do BCG foram reativados através da incubação em meio RPMI ou macrófago SFM sem antibióticos por 30 minutos a 37°C e 5% de CO_2 .

Para infecção das células, o meio de cultura foi removido e a suspensão micobacteriana foi adicionada nos poços e mantida por duas horas em atmosfera aeróbica a 37°C , a uma taxa de infecção de 1:1 para ensaios de obtenção de VE ou 10:1 nos experimentos de tratamento de macrófagos com VE. Após o tempo de infecção, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS 1x pré-aquecido a 37°C para remoção dos bacilos extracelulares. Gentamicina foi adicionada para eliminar os bacilos que não foram internalizados, seguido da adição de meio de cultura perfazendo um volume final de 1mL/poço em placas de 24 poços. Em todos os ensaios houve também macrófagos que não foram infectados, como controle.

5.6. AVALIAÇÃO DA CARGA BACILAR PELA ENUMERAÇÃO DE CFU

Para quantificação da carga bacilar intracelular do BCG por CFU, macrófagos infectados foram permeabilizadas com meio 7H9 contendo saponina a 10% ou Triton X-100 a 0,1%. Diluições seriadas foram preparadas utilizando meio 7H9 e posteriormente alíquotas de 50 μL foram cultivadas em placas de Petri contendo meio sólido 7H10 suplementado com 10% de OADC em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por 45 dias; as colônias foram quantificadas macroscopicamente na superfície do meio 7H10 conforme surgimento.

5.7. VIABILIDADE CELULAR PELA RESAZURINA

Para avaliar a viabilidade celular, o meio de cultura foi removido e acrescentou-se novo meio de cultura contendo 10% de resazurina nos poços teste, sem células (controle negativo) e somente com o meio (branco), todas as condições em triplicata. A resazurina é um corante azul não fluorescente que é reduzido a resorufina, altamente fluorescente de cor rosa em resposta a atividade metabólica da célula

(RAMPERSAD, 2012). As culturas foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂, em seguida o sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato e lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de 570nm e 600nm. Os resultados foram aplicados na fórmula abaixo:

$$\frac{(\varepsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{ox})\lambda_1 A \lambda_2}{(\varepsilon_{red})\lambda_1 A' \lambda_2 - (\varepsilon_{red})\lambda_2 A' \lambda_1} \times 100$$

onde ε_{ox} é o coeficiente de extinção molar de resazurina na forma oxidada (azul), ε_{red} é o coeficiente de extinção molar de resorufina na forma reduzida (rosa), A representa a absorbância dos poços, A' representa a absorbância do controle negativo, λ_1 representa o resultado da leitura no comprimento de onda 570nm, enquanto λ_2 representa o resultado da leitura no comprimento de onda 600nm. O cálculo da redução na viabilidade em cada condição de cultivo foi realizado no Microsot Excel 2013.

5.8. ISOLAMENTO DE VE A PARTIR DE MACRÓFAGOS HUMANOS E DO PLASMA

Para o isolamento de VE liberadas de macrófagos derivados de monócitos infectados ou não pelo BCG, o sobrenadante da cultura foi coletado e submetido a sucessivas centrifugações e ultracentrifugações. A princípio, o sobrenadante foi colhido e centrifugado uma vez a 500 x g por 10 min a 4°C para remoção de células vivas. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado uma vez a 1500 x g por 10 minutos a 4°C para remoção de células mortas. Em seguida, o sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo, agora específico para ultracentrífuga e ultracentrifugado uma vez a 8.000 x g por 10 minutos a 4°C para remover as células residuais, corpos apoptóticos e detritos celulares. Após esta ultracentrifugação, o sobrenadante contendo as VE foi transferido para um novo tubo de ultracentrífuga e ultracentrifugado duas vezes a 100.000 x g por 45 minutos a 4°C. Após o primeiro ciclo, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as VE foi ressuspensão em PBS. Por fim, o precipitado contendo as VE foi ressuspensão em PBS, filtrado em um filtro de 0,2µm, quantificadas por dosagem de proteínas (descrito a seguir) e por fim congeladas a -80°C até o uso.

Além de VE do sobrenadante de cultura, obtivemos VE do plasma de doadores saudáveis. Para isso, o plasma foi coletado em tubos de heparina, diluído em PBS na proporção de 1:4 e submetido aos processos de centrifugação, ultracentrifugação, filtragem e dosagem de proteínas descritos anteriormente.

5.9. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas presentes nas preparações de VE foi realizada seguindo as instruções do fabricante do kit BCA (ThermoScientific). Resumidamente, foi preparada uma curva diluindo a albumina que vem no kit através de diluições seriadas. As amostras foram diluídas em PBS (ou o tampão que estão suspensas) na presença de 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS) devido a presença de lipídios/lipoproteínas. Um tubo contendo somente PBS foi considerado como branco. Os tubos das amostras, da curva e o branco foram homogeneizados com uma mistura dos reagentes Ma, Mb e Mc do kit e em seguida incubados por 2 horas a 37°C ao abrigo da luz. Após a incubação, as amostras e a curva foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo chato e lidas no espectrofotômetro selecionando o programa para BCA (ácido bicinconínico) e leitura em 562nm.

5.10. PADRONIZAÇÃO

A primeira etapa de desenvolvimento do projeto foi a de padronização, nessa fase, o sobrenadante da cultura foi colhido em 3 dias diferentes para a obtenção de VE. Nos dias 3, 6 e 9 após a infecção, o sobrenadante de cultura de células infectadas e não infectadas (como controle) foi colhido e submetido aos processos de centrifugação e ultracentrifugação descritos anteriormente para obtenção de VE-Meio (vesículas extracelulares de macrófagos não infectados) e VE-BCG (vesícula extracelulares de macrófagos infectados pelo BCG). Nos dias da cinética foram avaliados também a viabilidade dos macrófagos através da resazurina e a carga bacilar por CFU.

Através da avaliação dos resultados da quantificação de proteínas das VE-Meio e VE-BCG (dias da cinética), viabilidade das células e carga bacilar intracelular foi escolhido o dia ideal para obtenção das VE. A partir daí, as VE passaram a ser isoladas no dia escolhido para em seguida serem caracterizadas morfológicamente,

por tamanho e concentração, moléculas de superfície, conteúdo interno, avaliação do efeito imunoestimulador e da atividade antimicobacteriana.

5.11. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE VE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para avaliação morfológica, 10µl da suspensão de VE-Meio, VE-BCG e VE-Plasma foi gotejada sobre grades de cobre revestidas com formvar e deixadas por 20 minutos a temperatura ambiente para a deposição. O excesso de líquido foi retirado com uma tira de papel filtro, em seguida, 10µl do contrastante acetato de uranila a 2% foi gotejado sobre a grade por 1 minuto para permitir a contrastação. Repetiu-se o processo para retirar o excesso de líquido e as grades foram deixadas secando a temperatura ambiente. Após 24 horas, as grades foram examinadas no microscópio eletrônico de transmissão.

5.12. QUANTIFICAÇÃO DE VE POR ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)

O tamanho e a concentração das VE purificadas foram determinadas utilizando o equipamento NanoSight NS300. As partículas foram capturadas por uma câmera CCD e com auxílio de um software, cada partícula teve seu movimento acompanhado para mensuração de seu tamanho e concentração em suspensão aquosa. Foi adicionada no compartimento detecção do aparelho 500 µL das amostras contendo 25µg de VE diluídas em PBS. Foram realizadas três capturas de 30 segundos de duração (20 frames por segundo) sob temperatura de 20°C. Utilizamos 25µg de VE-Meio, VE-BCG e VE-Plasma para análise por NTA.

5.13. FENOTIPAGEM DAS VE

Para avaliar a externalização da fosfatidilserina na superfície da membrana das VE e a integridade da membrana, suspensões de VE-Meio, VE-BCG e VE-Plasma foram marcadas com anexina V e PI (iodeto de propídio), de acordo com as instruções do fabricante (Annexin V Apoptosis Detection kit - Sigma). Resumidamente, um *pool* preparado com a união de 3 lotes diferentes de cada condição de VE foi tratado com 5µl anexina V, tampão de ligação e 10µl de PI. Após o tratamento, o material foi incubado ao abrigo da luz por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida,

analisados por citometria de fluxo. Para confirmar a origem macrofágica das VE e o possível papel na apresentação de antígenos, um *pool* de VE preparado como descrito anteriormente foi utilizado para marcação com 5µl de anti-HLA-DR (BD Biosciences) e 5µl anti-CD68 (eBioscience) por 30 minutos a temperatura ambiente e em seguida, analisados por citometria de fluxo.

5.14. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO INTERNO DE VE

As preparações de VE foram analisadas pela detecção das citocinas e quimiocina IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF. Para isso, as VE foram lisadas utilizando tampão RIPA e tiveram suas proteínas quantificadas por BCA. Em seguida, 4µg de VE-Meio, VE-BCG e VE-Plasma foram analisadas utilizando ensaio multiparâmetro com microsferas de látex recobertas com anticorpos (CBA) e leitura em citômetro de fluxo. O ensaio foi realizado de acordo com instruções do fabricante (BD Biosciences).

5.15. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR BCG APÓS TRATAMENTO COM VE

Macrófagos humanos derivados de monócitos foram infectados por BCG na proporção MOI de 10:1 e em seguida tratados com 50µg/mL de VE-Meio, VE-BCG ou VE-Plasma por 24h. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram rompidas com meio 7H9 contendo saponina a 10% ou Triton X-100 a 0,1% e a atividade antimicobacteriana dos macrófagos foi avaliada através da quantificação da carga bacilar intracelular por CFU em estufa bacteriológica, por 45 dias a 37°C em triplicata. Macrófagos não tratados foram usados como controle.

5.16. AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOESTIMULADOR DE VE

Culturas de macrófagos de 7 doadores saudáveis infectados ou não pelo BCG (MOI 10:1) foram tratadas com 50µg/mL de VE-Meio, VE-BCG ou VE-Plasma por 24h (como controle foram usadas células sem tratamento). Após o tratamento, o sobrenadante de cultura dos grupos tratados e não tratados foram coletados, centrifugados brevemente para retirar células mortas e/ou detritos celulares e foram armazenados a -20°C. Análises em ensaio para detecção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF foi realizado por CBA de acordo com as instruções do fabricante (BD

Biosciences). Além da dosagem de citocinas, a viabilidade celular foi avaliada após o tratamento com VE utilizando o ensaio da resazurina.

5.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para identificação de diferenças entre grupos foi considerado o nível de significância de 95%. As comparações entre dois grupos experimentais foram feitas pelo teste t de Student para grupos independentes ou pelo teste de Mann-Whitney, para variáveis com distribuição paramétrica ou não paramétrica respectivamente. Da mesma forma, comparações entre mais de dois grupos foram realizadas utilizando o teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, ou teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. A determinação do tipo de distribuição foi feita pelo teste de D'Agostino e Pearson.

6. RESULTADOS

6.1. OBTENÇÃO DO INÓCULO

O BCG (Moreau/RJ) inicialmente liofilizado ou o inóculo já preparado foi reativado, cultivado e por fim quantificado por CFU. A partir do sétimo dia de incubação, as primeiras colônias formadas foram visualizadas macroscopicamente e então enumeradas até os 45 dias de cultivo.

Foram preparados 15 inóculos de BCG com concentrações conhecidas que variaram de $1,10 \times 10^5$ a $3,22 \times 10^8$ bacilos/mL (Figura 5). Variações nas concentrações foram decorrente da origem do inóculo, aqueles obtidos a partir da reativação de inóculos previamente congelados e mantidos a -70°C apresentaram concentrações inferiores aos inóculos obtidos a partir da cepa liofilizada (Figura 5).

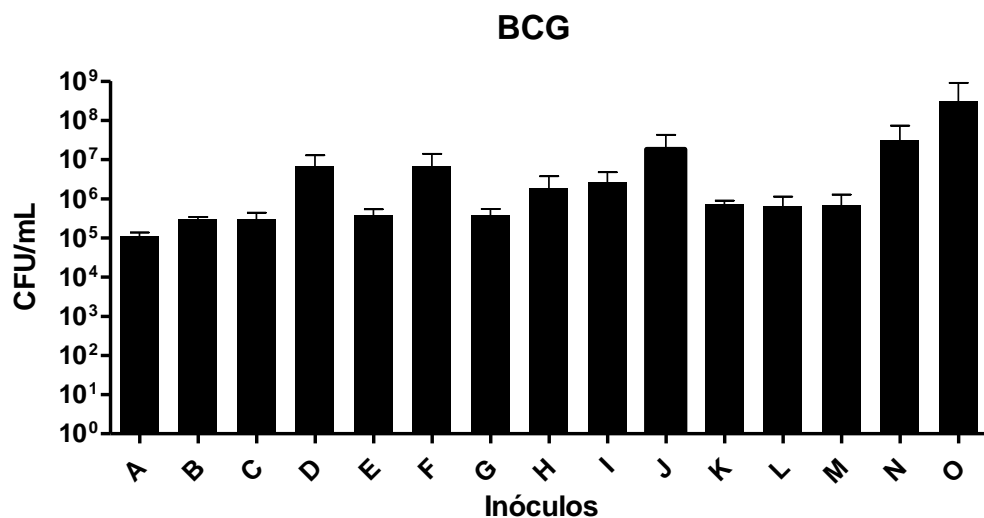


Figura 5 - Concentração de inóculos gerados da BCG.

Inicialmente, os bacilos foram reativados em 7H9 e posteriormente repicados em 7H10 sem glicerol para quantificação de CFU. Os inóculos obtidos variaram entre $1,10 \times 10^5$ a $3,22 \times 10^8$ bacilos/mL em concentração. A maior concentração foi obtida da amostra liofilizada. Dados estão representados em média e desvio padrão a partir das colônias quantificadas por inóculo durante os 45 dias de incubação. A-N: inóculos obtidos a partir de cepas conservadas em temperatura -70°C . O: inóculo obtido de cepa liofilizada. Todas as cepas foram de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau/RJ, cedidas pelo INCQS/FIOCRUZ/RJ.

6.2. PADRONIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE VE DE MACRÓFAGOS

Na fase de padronização, VE foram isoladas de sobrenadante de cultura de macrófagos humanos. A partir da cinética experimental, os dias 3, 6 e 9 pós infecção com BCG (MOI 1:1) foram selecionados para isolamento de VE. Os critérios utilizados

para a escolha do dia ideal em liberação de VE incluíram: viabilidade celular, concentração de proteínas e carga micobacteriana intracelular.

6.2.1. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada por leituras espectrofotométrica da medição de redução de resazurina em resorufina. Foram testadas duas condições de cultivo das células: na primeira, meio de cultura foi acrescido apenas imediatamente após a infecção, sem acréscimo até o fim da cinética (Figura 6A);. na segunda condição, meio de cultura foi acrescido em 25%, após 72h de infecção (Figura 6B).

Na condição sem adição de meio foi observada uma gradual queda na viabilidade celular no grupo de células não infectadas, finalizando a cinética com cerca de 37% de células viáveis. Enquanto a viabilidade do grupo de células infectadas manteve-se estável até o sexto dia após infecção, exibindo uma tendência a diminuição apenas após esse dia, finalizando a cinética com 59% de células viáveis. Observou-se a correção da diminuição da viabilidade, na segunda condição, quando foi feita adição de meio de cultura periodicamente. Nessa condição ambos os grupos apresentaram viabilidade superior a 90% até final da cinética.

Considerando que a viabilidade das células é fator crucial para liberação de VE, a adição de meio de cultura após 72h da infecção foi considerada como condição essencial para manter a viabilidade celular até final da cinética.

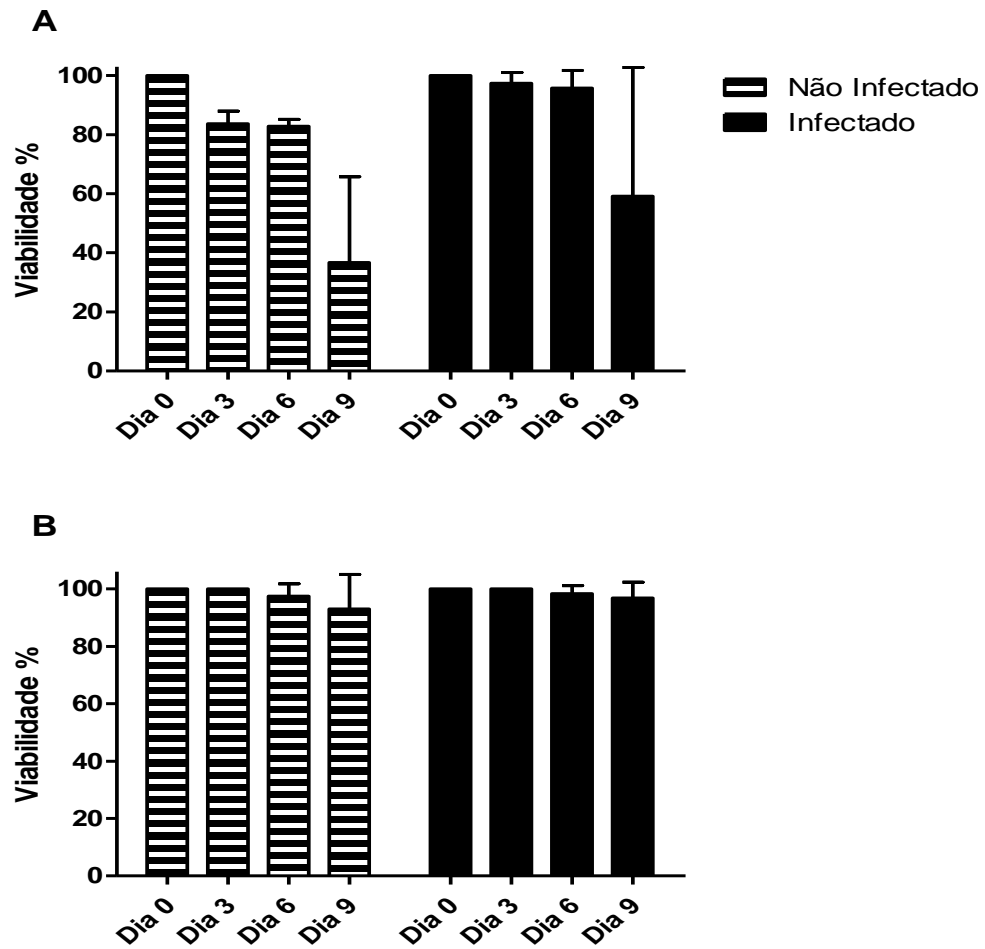


Figura 6 - Avaliação da viabilidade celular durante cinética experimental.

A viabilidade celular avaliada após a medição de redução de resazurina em resorufina. A absorbância foi lida nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm. Os ensaios foram realizados nos dias 0, 3, 6 e 9 após a infecção. A viabilidade celular foi analisada em duas condições: sem posterior adição de meio de cultura (A) ou com a adição de meio após 72h da infecção (B). Dados representados em média e desvio padrão de experimentos independentes.

6.2.2. Dosagem de proteínas em VE

VE foram isoladas do sobrenadante da cultura de macrófagos infectados ou não pelo BCG (MOI 1:1) nos dias 3, 6 e 9 após a infecção. A dosagem de proteínas das VE pela técnica do BCA foi utilizada como método para quantificação. Na tabela 1 está representado o resultado da quantificação de proteínas nas VE nos dias indicados pela cinética. O dia 6, as concentrações proteicas foram ligeiramente maiores em ambos os grupos (337,3 μ g/mL em células infectada e 252,7 μ g/mL em células não infectadas). No dia 9 pós infecção, as concentrações proteicas foram 291,6 μ g/mL e 251,1 μ g/mL para VE de células infectadas e não infectadas,

respectivamente. Esses dados sugerem que esses são os dias com maior liberação de VE por macrófagos.

Tabela 1 - Dosagem de proteínas de VE por BCA.

	Infectado	Não Infectado
Dia 3	246,3ug/mL	242,2ug/mL
Dia 6	337,3ug/mL	252,7ug/mL
Dia 9	291,6ug/mL	251,1ug/mL

VE isoladas do sobrenadante de cultura de macrófagos humanos infectados ou não por BCG nos dias 3, 6 e 9 após a infecção foram lisadas por SDS e tiveram sua concentração proteica dosada pelo BCA seguindo as instruções do fabricante (ThermoScientific). Dados representativos da medição de um *pool* do sobrenadante de 3 3 poços em placas de 24 poços contendo 10^6 células/mL para cada condição.

6.2.3. Avaliação da carga bacteriana intracelular

Houve a oportunidade de realizar um ensaio em que a carga bacilar intracelular foi avaliada por CFU em macrófagos humanos infectados por BCG nos dias 3, 6 e 9 após a infecção em um único experimento. Não foi observada diferença na redução da carga bacilar do BCG nos dias testados, sugerindo que os macrófagos permaneciam infectados durante toda a cinética (Figura 7) levando em conta que a viabilidade das culturas não apresentou variação (dados não mostrados).

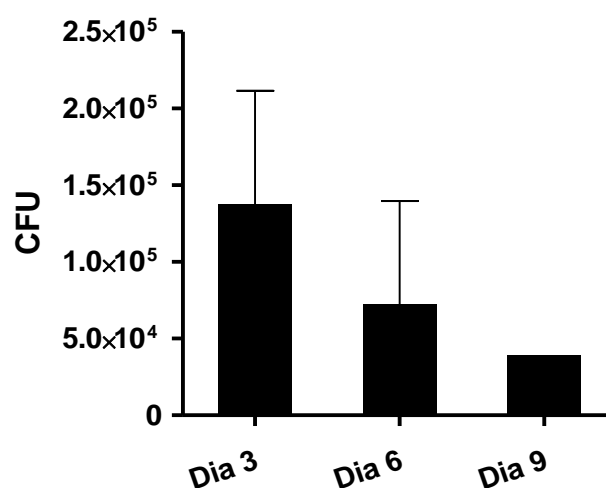


Figura 7 - Carga bacilar intracelular durante cinética experimental.

As células foram permeabilizadas e os bacilos intracelulares foram ressuspensos em 7H9 e posteriormente repicados em 7H10 para quantificação de CFU. Dados representados pela quantificação de colônias em média e desvio padrão de duplicatas nos dias 3 e 6 e de um único poço no dia 9 durante 45 dias de incubação em um único experimento.

Considerando a viabilidade celular superior a 95% (Figura 6), carga bacilar confirmando a estimulação de macrófago (Figura 7) e maior concentração de VE liberadas tanto por células infectadas quanto não infectadas (Tabela 1), escolhemos o dia 6 após a infecção como dia ideal para isolamento das mesmas. A partir de então, as VE passaram a ser isoladas sob as condições padronizadas de infecção e tempo.

6.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS VE

Para caracterização morfológica, as VE foram depositadas em grades de carbono revestidas com formvar e observadas pelo MET entre os aumentos de 100.000 – 200.000 vezes. Na figura 8 estão representados aglomerados de VE pequenas encontradas distribuídas uniformemente nas grades e a presença de VE maiores que foram encontradas em menor frequência nas grades de VE-Meio (figura 8, A), VE-BCG (figura 8, B) e VE-Plasma (figura 8C).

A análise por MET confirmou a eficiência do nosso protocolo para isolamento de VE. Foram observadas VE com tamanhos diversos que variaram de 20nm a 350nm, sugerindo uma mistura heterogênea de exossomos (30nm-150nm) e microvesículas (100nm-1000nm).

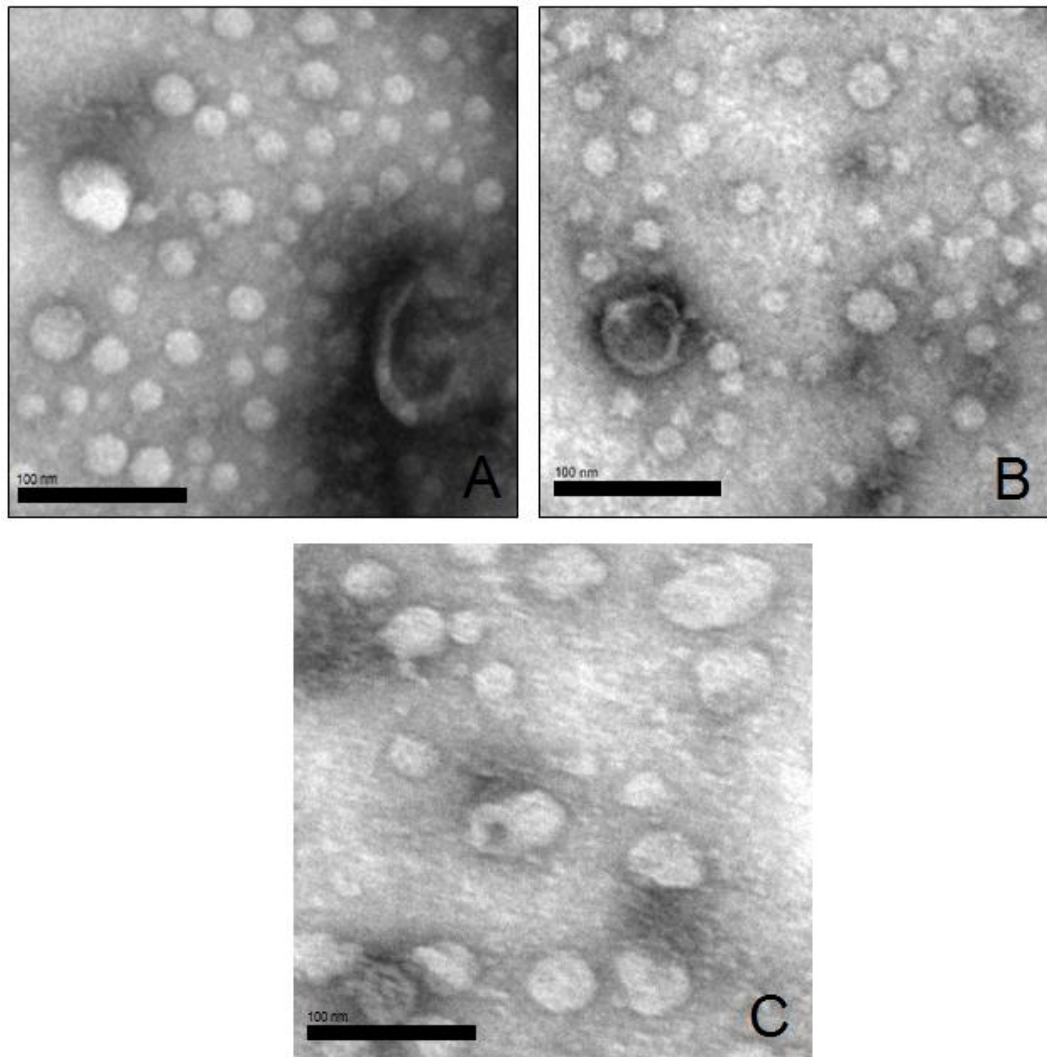


Figura 8 - Caracterização morfológica de VE.

VE depositadas em grades de cobre revestidas por formvar foram contrastadas por acetato de uranila a 2% e visualizadas por MET nos aumentos de 100.000-200.000 vezes. Nos quadrados estão representadas as VE encontradas distribuídas homogeneamente nas grades (barra de escala 100nm). A: VE-Meio; B: VE-BCG; C: VE-Plasma.

6.4. ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)

Para avaliar o tamanho e a concentração das VE, foi realizada a análise de rastreamento de nanopartículas através de um sistema que utiliza um microscópio e uma fonte de laser que faz possível a visualização das VE usando o equipamento NanoSight NS300.

Foram realizadas três capturas de 30 segundos de duração (20 frames por segundo). Na Figura 9 estão representadas imagens de um *frame* para cada uma das condições de VE obtidas. Na figura 9A está demonstrado a imagem de um frame obtido a partir do PBS, diluente utilizado para ressuspender as VE no processo de

obtenção e para diluição do material para ser analisado pelo NTA, o PBS foi usado como branco na análise. VE-Meio, VE-BCG e VE-Plasma estão representados nas figuras 9B, 9C e 9D, respectivamente.

Nas imagens produzidas pelos *frame* vídeos é possível confirmar o formato das VE visualizadas pela MET. Não foi observada diferença no tamanho das VE, entretanto as VE-Plasma mostram-se muito mais concentradas que os demais grupos.

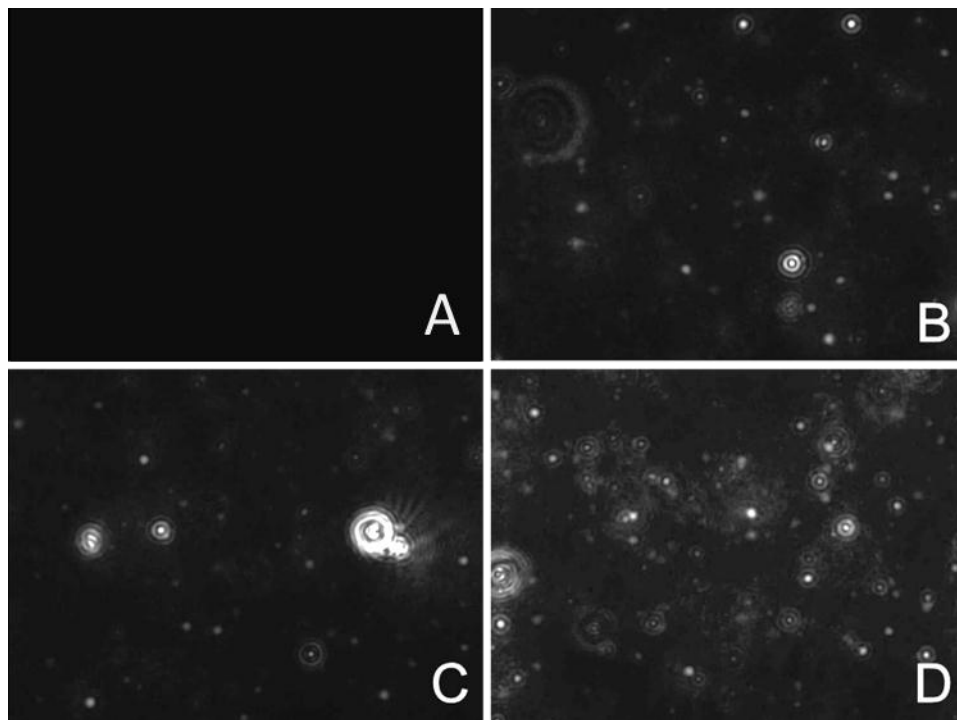


Figura 9 - Análise quantitativa de VE por NTA.

25 μ g de VE foram diluídas em PBS e avaliadas por NTA usando o equipamento Nanosight NS300. Foram realizadas três capturas de 30 segundos de duração (20 frames por segundo). Imagem representativa de um Frame do frame vídeo produzido a partir do PBS como branco (A), VE-Meio (B), VE-BCG (C) e VE-Plasma (D).

Com o auxílio de um software as VE tiveram seu movimento acompanhado para mensuração de seu tamanho e concentração. A distribuição das VE pela concentração (eixo y) e tamanho (eixo x) está ilustrado na figura 10. Em figura 10A, estão representadas as VE-Meio, com diâmetro que chegou a 451nm e a moda de 158nm (pico). Na figura 10B, a distribuição das VE-BCG, com diâmetro máximo de 460nm e a moda de 123nm. Na figura 10C, estão representadas as VE-Plasma com diâmetro máximo detectado de 514nm e moda de 129nm. Na figura 10D, está representada a comparação entre todos os grupos, aonde se destaca a distribuição das VE-Plasma sobre os outros grupos devido a sua maior concentração de partículas/mL. Esses resultados confirmam o tamanho de VE que observamos por

MET e excluem a possibilidade de contaminação das nossas preparações com corpos apoptóticos.

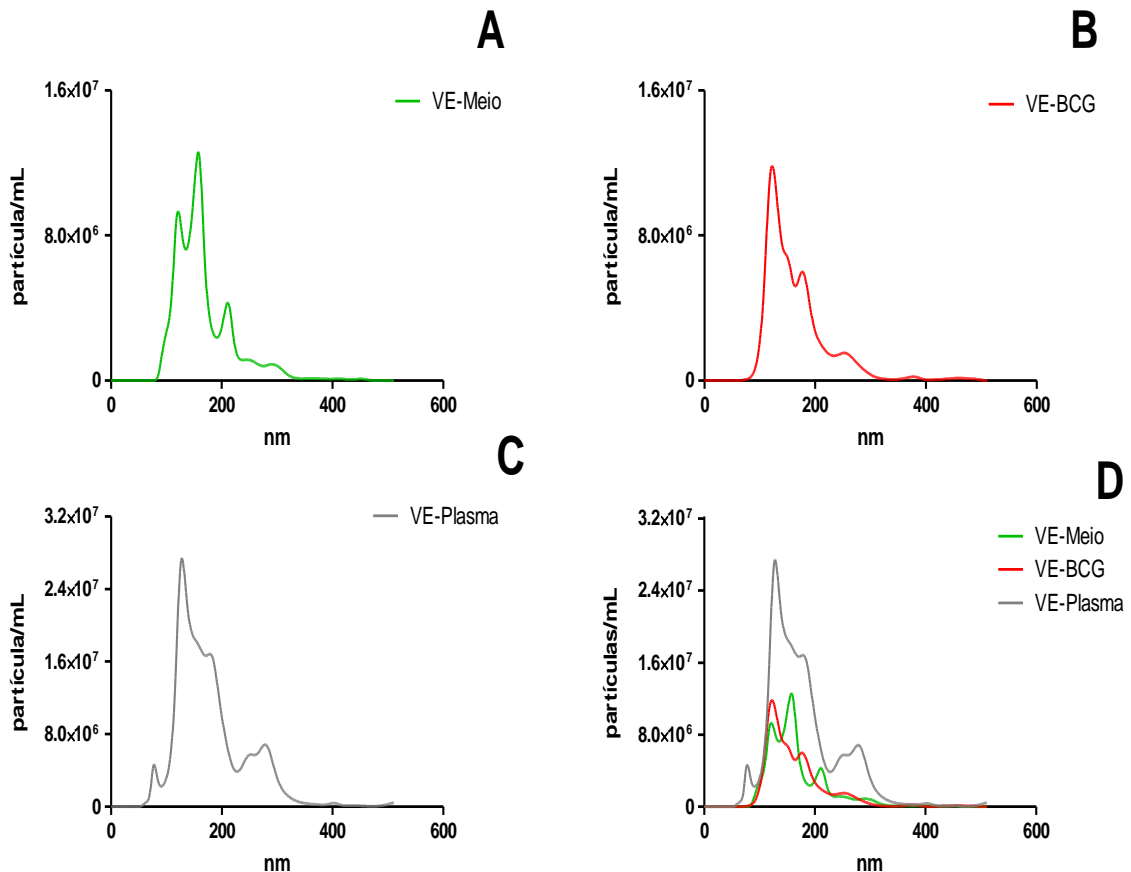


Figura 10 - Distribuição das VE por tamanho.

25 μ g de VE foram diluídas em PBS e avaliadas por NTA usando o equipamento Nanosight NS300. O tamanho e a concentração das VE foram medidas e estão representadas no gráfico por tamanho (eixo X) e concentração (eixo Y). Dados representados pela média dos valores obtidos de três ensaios para 25 μ g de proteínas de VE-Meio (A), VE-BCG (B) e VE-Plasma (C). Em D as distribuições dos três grupos de VE foram representadas agrupadas.

A quantificação das VE está representada na figura 11. Em 11A, está demonstrado a semelhança no tamanho médio das VE dos diferentes grupos, onde as VE-Meio tinham tamanho médio de 167nm, seguido por 165nm das VE-BCG e as VE-Plasma com 179nm. Quanto a concentração, assim como visualizado pelos *frames vídeo*, as VE-Meio e VE-BCG exibiram concentrações semelhantes, com $8,81 \times 10^8$ e $8,42 \times 10^8$ partículas/mL respectivamente, enquanto que o grupo VE-Plasma apresentou a concentração de $2,43 \times 10^9$ partículas/mL, quase 3 vezes maior que a

concentração dos grupos anteriores considerando a mesma quantidade de proteínas em todos os grupos (Figura 11B).

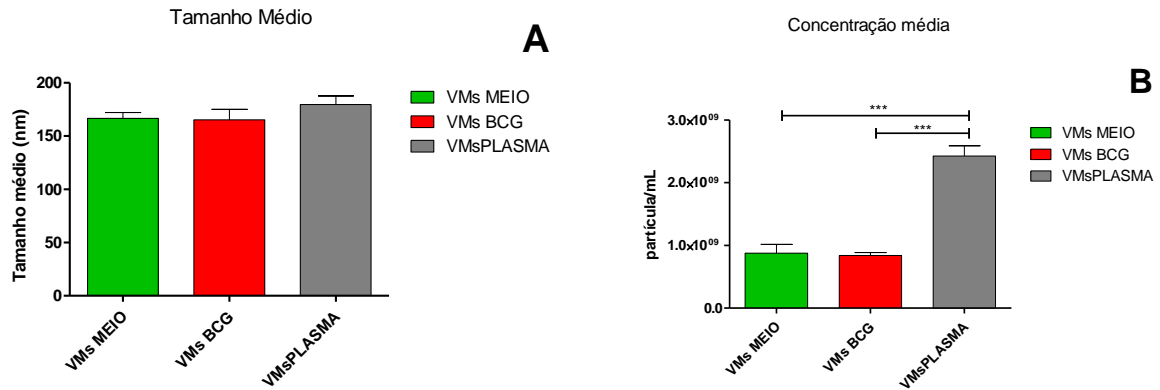


Figura 11 - Rastreamento de VE por NTA.

VE em suspensão foram capturadas por uma câmera CCD, cada partícula teve seu movimento acompanhado para mensuração do tamanho (A) e concentração (B) pelo NanoSight NS300. As barras representam a média e o desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

6.5. FENOTIPAGEM DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MACRÓFAGOS E DO PLASMA.

6.5.1. Externalização da fosfatidilserina

A externalização da fosfatidilserina foi avaliada em VE isoladas de macrófagos infectados ou não pelo BCG mantidos em cultivo por 6 dias ou isoladas do plasma de doadores saudáveis através da marcação com Anexina V e PI; a marcação com PI foi utilizada para excluir a possibilidade de contaminação por corpos necróticos.

Observou-se a marcação positiva para Anexina V em 14,84% das VE-BCG, 21,57% de VE-Meio e 95,61% para VE-Plasma (Figura 12). A baixa marcação por PI exclui a contaminação por corpos necróticos bem como confirma a integridade da membrana das VE.

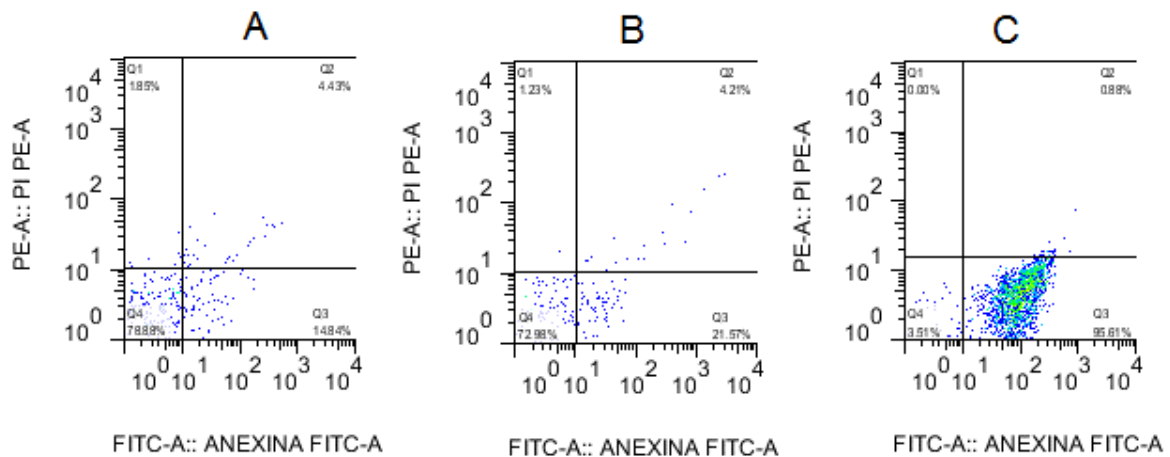


Figura 12 - Citometria de fluxo de VE marcadas com Anexina V/PI.

Dot plots representativos da marcação de um *pool* preparado com a união de 3 lotes diferentes de VE-BCG (A), VE-Meio (B) e VE-Plasma (C) marcadas com anexina V/PI em um único experimento. Detritos foram excluídos das análises. Pelo menos 1.000 eventos foram analisados para VE-BCG e VE-Meio e 10.000 eventos para VE-Plasma.

6.5.2. Marcação de VE com anti-CD68 e anti-HLA-DR

Um *pool* de 3 lotes diferentes de VE derivadas de macrófagos e do plasma, obtidas conforme descrito anteriormente foi marcado com um anticorpo específico para macrófago (anti-CD68) para confirmar a origem macrofágica dessas preparações, bem como com anticorpo contra um receptor da superfície celular de MHC de classe II (anti-HLA-DR) para avaliar o possível papel dessas VE na apresentação de antígenos (Figura 13). Ao lado esquerdo da figura estão representados os *dot plots* da marcação do anti-CD68 e anti-HLA-DR. Foi selecionado um *gate* apenas com as VE CD68 positivo. Ao lado direito estão representados histogramas da positividade do HLA-DR entre as VE CD68 positivo (selecionadas no *gate*).

Na figura 13, A, estão as VE não marcadas como controle, demonstrando que não há positividade para as moléculas testadas excluindo a possibilidade de resultados falso-positivo.

A marcação positiva para CD68 foi observada em 68,58% de VE-Meio, 58,54% de VE-BCG e 94,47% de VE-Plasma, sugerindo uma grande prevalência de VE de origem macrofágica ou que pelo menos expressam uma molécula altamente presente em macrófagos. Entre essas VE CD68 positivas, a dupla marcação com HLA-DR foi observada em 71,25% de VE-Meio (Figura 13, B), 61,22% VE-BCG (Figura 13, C) e

82,21% de VE-Plasma (Figura13, D), demonstrando o possível papel dessas VE na apresentação de antígenos.

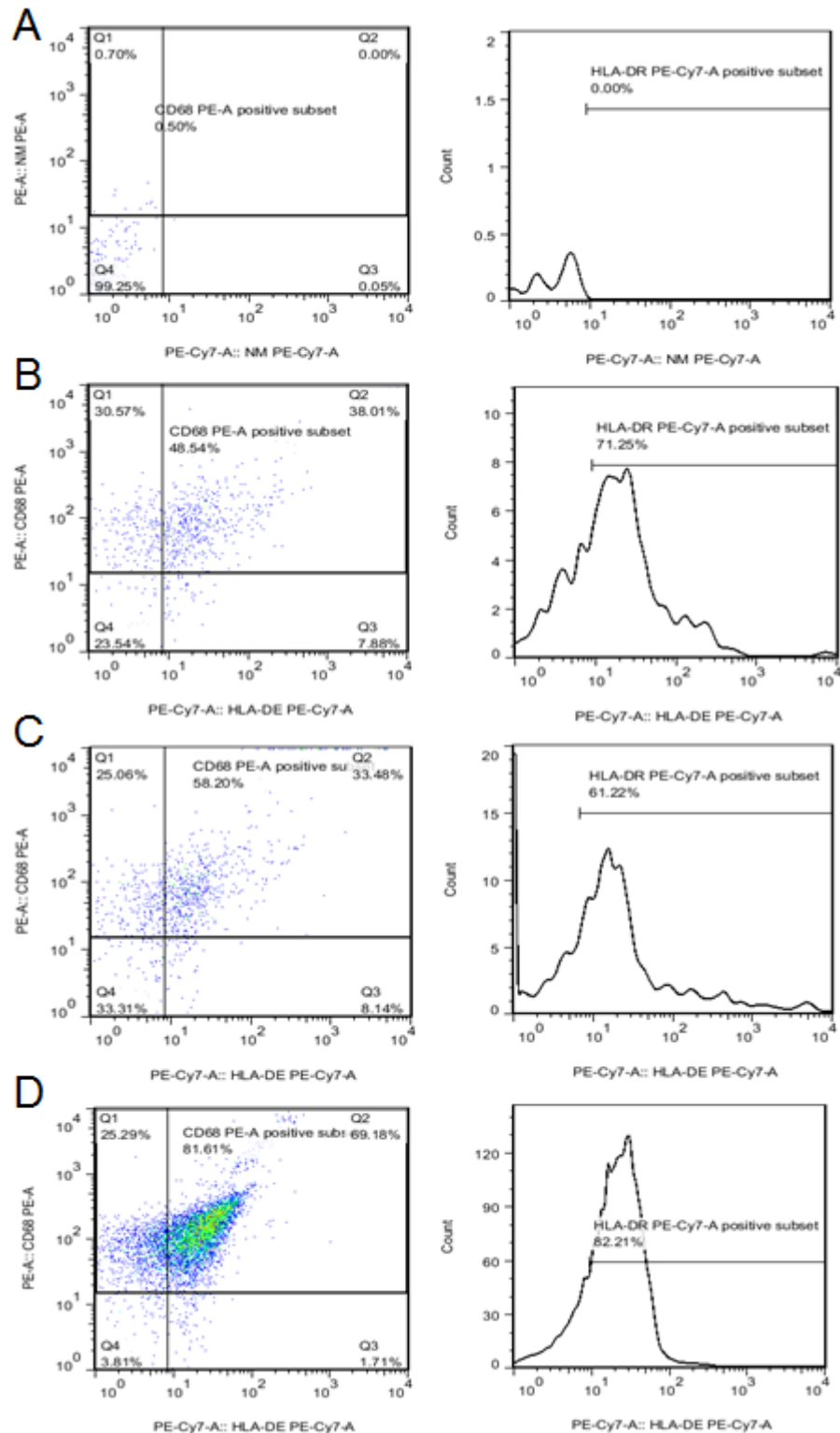


Figura 13 - Citometria de fluxo de marcadas com anti-CD68 e anti-HLA-DR.

Um *pool* preparado com a união de 3 lotes diferentes de VE foi marcado com anti-CD68 PE e anti-HLA-DR PE Cy7 por 30 minutos ao abrigo da luz e em seguida analisadas por citometria de fluxo. Ao lado esquerdo estão representados os *dot plots* da marcação do anti-CD68 e anti-HLA-DR. Foi selecionado um *gate* apenas com as VE CD68 positivo. Ao lado direito está representado a positividade do HLA-DR entre as VE CD68 positivo. Dados

representativos de um único experimento onde pelo menos 1.000 eventos foram analisados para VE-BCG e VE-Meio e 10.000 eventos para VE-Plasma. A: Não marcado; B: VE-Meio; C:VE-BCG; D: VE-Plasma. Detritos foram excluídos das análises.

6.6. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO INTERNO DAS VE

Para avaliar se VE carregam citocinas internamente, 4 μ g de VE foram lisadas utilizando o tampão RIPA e foram analisadas para a presença das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF por CBA de acordo com as recomendações do fabricante (BD Bioscience). Foram observados níveis detectáveis de IL-6 e IL-8 em VE-BCG, assim como de TNF em todos os grupos (Figura 14). Destacam-se níveis aumentados de IL-6 em VE-BCG quando comparadas a VE-Meio e níveis aumentados de IL-8 em VE-BCG quando comparadas a VE-Meio e VE-Plasma. Esses níveis aumentados de moléculas pró-inflamatórias podem de alguma forma desencadear respostas nas células receptoras, que ainda não foram bem caracterizadas. Não foram observados níveis detectáveis das citocinas IL-1 β e IL-10 em nenhuma das preparações de VE.

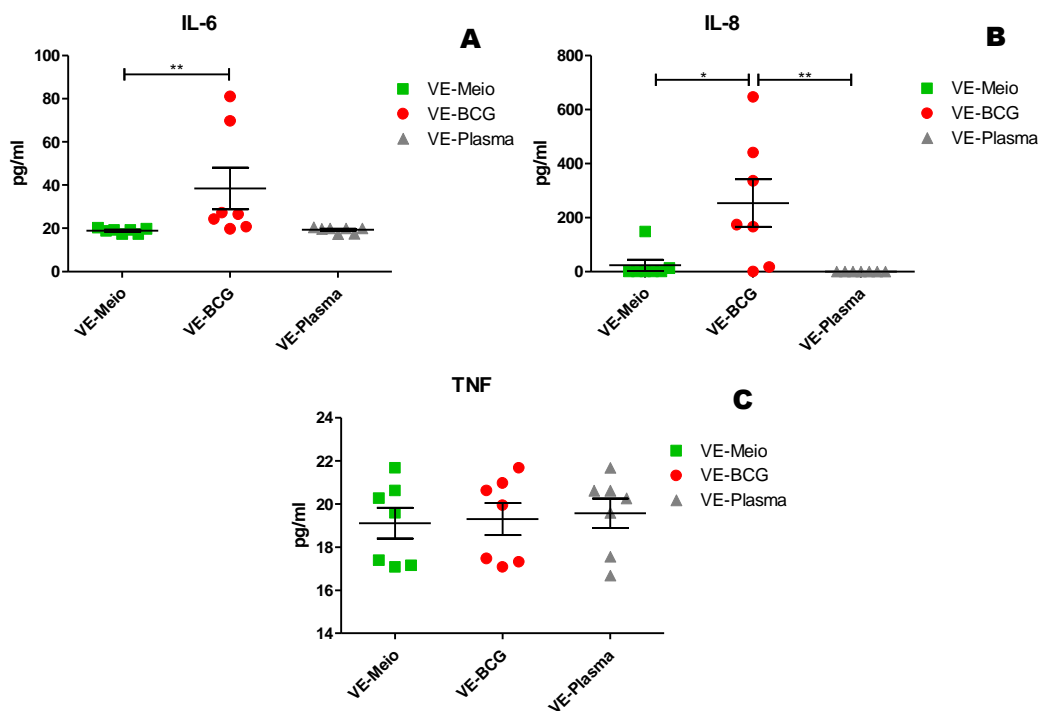


Figura 14 - Dosagem de citocinas internas em VE

A quantificação de citocinas foi realizada em 4 μ g de VE lisadas pelo tampão RIPA por citometria de fluxo, utilizando o kit CBA inflamatório. Foram encontrados níveis detectáveis das citocinas IL-6 (A), IL-8 (B) e TNF (C) nas VE de diferentes condições. Os valores correspondem a média e desvio padrão de 7 lotes diferentes de VE. * p < 0,05 quando comparado com os demais grupos usando o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

6.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM VE.

A atividade antimicobacteriana de macrófagos foi avaliada após o tratamento com VE por 24 horas através da quantificação da carga bacilar intracelular por CFU durante 45 dias. A média de colônias quantificadas do grupo não tratado no final de 45 dias de cultura foi considerado como índice 1. Observou-se uma tendência a reduzir a carga bacilar intracelular nos grupo de células tratadas com VE-BCG e VE-Plasma, com redução média de 37,5% neste experimento (Figura 15).

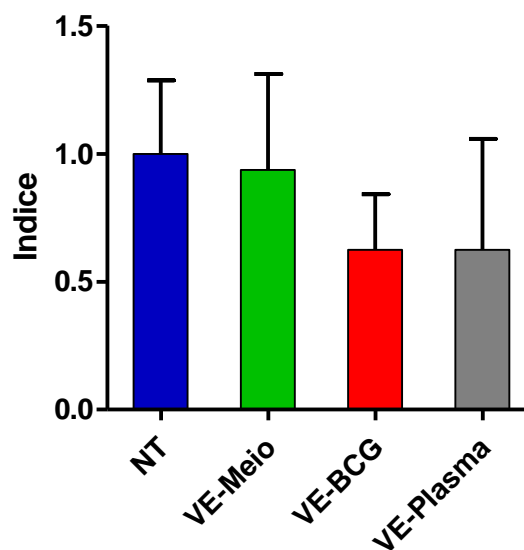


Figura 15 - Carga bacilar intracelular de BCG em macrófagos tratados com VE.

O gráfico mostra a razão do número de CFU obtido a partir da cultura de micobactérias dos grupos do tratamento em relação a cultura não tratada. Macrófagos humanos derivados de monócitos foram infectados por BCG (MOI 10:1) e em seguida tratados com 50µg/mL de VE-Meio, VE-BCG, VE-Plasma por 24h. As células foram permeabilizadas e os bacilos intracelulares foram cultivados para quantificação de CFU em 7H10 em triplicata. Macrófagos não tratados foram avaliados como controle.

6.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOESTIMULADOR DE VE

O efeito imunoestimulador de VE foi avaliado por BCA através da quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF no sobrenadante da cultura após 24 horas do tratamento com VE. Com exceção da IL-8, todas as citocinas tiveram seu níveis elevados após a infecção. O tratamento não foi responsável pela variação observada no aumento concentração de citocinas no grupo de células infectadas. Entretanto, observamos que o tratamento com VE-Meio elevou os níveis de IL-8 entre as células não infectadas em comparação com as células não tratadas (Figura 16).

Observamos uma grande variação no perfil de liberação de citocinas entre os voluntários do mesmo grupo e mesmo tratamento para células infectadas enquanto observamos perfis diferentes nas citocinas IL-6, IL-8 e TNF entre as células não infectadas.

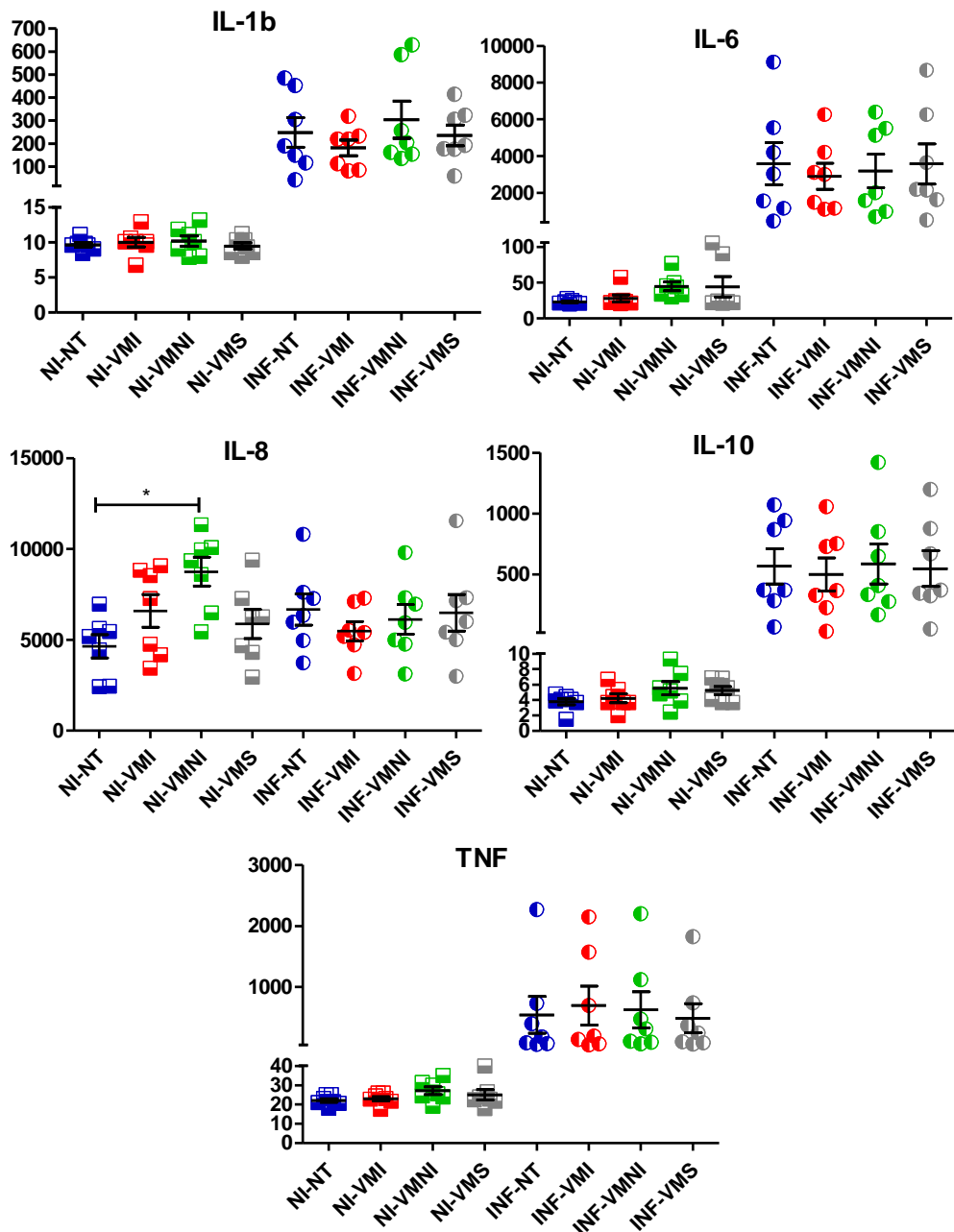


Figura 16 - Quantificação de citocinas após tratamento com VE.

Macrófagos humanos derivados de monócitos de 7 doadores saudáveis foram infectados ou não pelo BCG. Após a infecção, as células foram tratadas por 24 horas com VE-BCG, VE-Meio e VE-Plasma, o potencial imunestimulatório de VE foi avaliado pela detecção de citocinas no sobrenadante de cultura após o tratamento. Os valores correspondem a média e desvio padrão de 7 lotes diferentes de VE. * $p < 0,05$ quando comparado com

os demais grupos usando o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. NI-NT: células não infectadas sem tratamento com VE; NI-VE-Meio: células não infectadas tratadas com VE-Meio; NI-VE-BCG: células não infectadas tratadas com VE-BCG; NI-VE-Plasma: células não infectadas tratadas com VE-Plasma; INF-NT: células infectadas por BCG sem tratamento com VE; INF-VE-Meio: células infectadas por BCG tratadas com VE-Meio; INF-VE-BCG: células infectadas por BCG tratadas com VE-BCG; INF-VE-Plasma: células infectadas por BCG tratadas com VE-Plasma.

6.8.1. Avaliação da viabilidade celular após o tratamento com VE

Macrófagos humanos de doadores saudáveis infectados ou não pelo BCG foram tratados com 50 μ g/mL de VE por 24 horas. Após o tratamento, a viabilidade das células foi avaliada pela redução da resazurina. A análise da viabilidade demonstrou que mais de 90% das células estavam viáveis em ambos os grupos, sendo que as células que foram infectadas apresentaram redução na viabilidade. Apesar do tratamento não ter sido responsável por mudanças na viabilidade das células, foi observada uma tendência a corrigir a queda na viabilidade das células infectadas após o tratamento com VE-BCG (Figura 17).

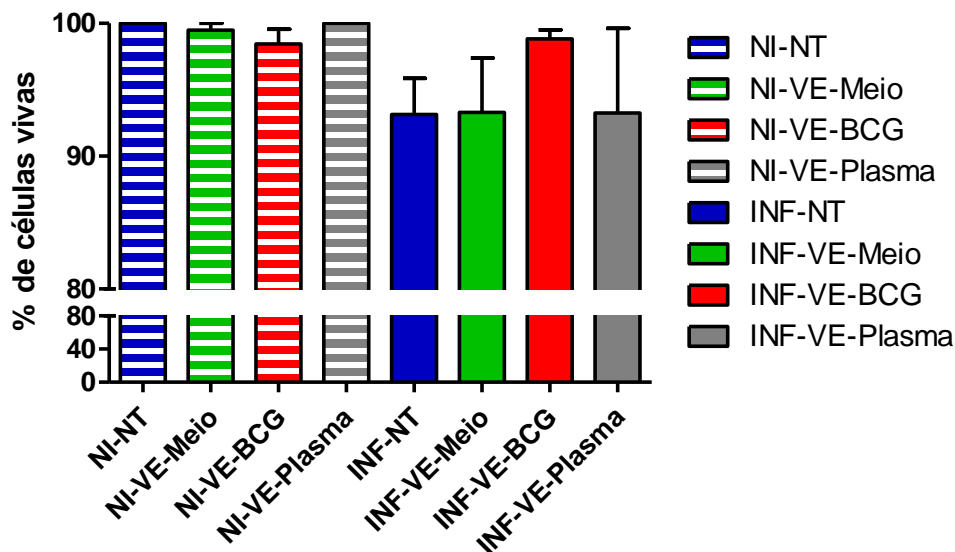


Figura 17 - Viabilidade celular após o tratamento com VE.

Foi adicionado meio de cultura a 10% de resazurina por poço em triplicata e incubado a 37°C e 5% CO₂ por 4h. A absorbância foi lida nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm. Foi avaliada a viabilidade de macrófagos humanos infectados ou não por BCG (MOI de 10:1) tratados com 50 μ g/mL de VE por 24h. Dados representados em média e desvio padrão de um único ensaio com 7 doadores. NI-NT: células não infectadas sem tratamento com VE; NI-VE-Meio: células não infectadas tratadas com VE-Meio; NI-VE-BCG: células não infectadas tratadas com VE-BCG; NI-VE-Plasma: células não infectadas tratadas com VE-Plasma; INF-NT: células infectadas por BCG sem tratamento com VE; INF-VE-Meio: células infectadas por BCG tratadas com VE-Meio; INF-VE-BCG: células infectadas por BCG tratadas com VE-BCG; INF-VE-Plasma: células infectadas por BCG tratadas com VE-Plasma.

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho caracterizamos VE liberadas de macrófagos infectados por BCG ou sem infecção, isoladas após 6 dias da infecção e VE isoladas diretamente do plasma de doadores saudáveis. A caracterização das VE levou em consideração o seu tamanho, forma e componentes. Procuramos também caracterizar as VE funcionalmente, avaliando sua potencial ação pró-inflamatória, imunoestimuladora e antimicobacteriana quando usadas como estímulo em cultura de macrófagos humanos.

Analisando a nossa padronização para a obtenção das VE, observamos que a infecção pelo BCG foi associada a maior liberação de VE em todos os pontos da cinética avaliados, o que está de acordo com outros trabalhos que demonstraram o aumento na liberação de VE por células ativadas ou que estão em estado apoptótico (THÉRY, OSTROWSKI e SEGURA, 2009).

A análise por MET confirmou a eficiência do nosso protocolo para isolamento de VE. Observamos VE-Meio, VE-BCG e VE-Plasma com tamanho variável de 20nm a 350nm e formato compatível com o descrito na literatura para VE liberadas de diversos tipos celulares, inclusive macrófagos infectados pelo MTB (ATHMAN *et al.*, 2015; CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2014; DRAGOVIC *et al.*, 2011; GUALERZI *et al.*, 2017). Essa caracterização foi corroborada pela análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), através da qual demonstramos a presença das VE em suspensão, com tamanho variando de 30nm a 500nm, aproximadamente equivalente quando comparadas as condições avaliadas. De acordo com as nossas observações por MET e NTA, é possível inferir que as VE isoladas são compostas heterogeneamente da mistura de exossomos (30nm-150nm) e microvesículas (100nm-1000nm) (RUTTER e INNES, 2017; TKACH e THÉRY, 2016; TRIPISCIANO *et al.*, 2017; WHITESIDE, 2018; YANG e LI, 2018). Esses resultados excluem a possibilidade da presença de corpos apoptóticos, que medem de 1µm-5µm de diâmetro (RUTTER e INNES, 2017; TRIPISCIANO *et al.*, 2017).

No ensaio de NTA usamos 25µg de VE para cada grupo. Mesmo com a mesma quantidade de proteínas usadas para todos os grupos e a pequena variação no tamanho médio das vesículas, observamos diferenças nas concentrações das partículas por ml, que foi mais acentuada nas VE-Plasma, com cerca de 3x a

concentração de partículas exibida por VE-Meio e VE-BCG. Essa diferença pode estar relacionada à composição das VE, sendo necessário realizar análises proteômicas para confirmar essa hipótese e avançar em relação à sua caracterização.

As VE têm sido classicamente caracterizadas pela confirmação da externalização da fosfatidilserina, uma característica que foi utilizada na literatura como parâmetro para a quantificação de VE utilizando citometria de fluxo. No entanto, estudos vêm demonstrando que essa classificação pode levar a uma subestimação da quantidade de VE, levando em consideração que nem todas as vesículas expressam a fosfatidilserina no folheto externo da membrana (BERNIMOULIN *et al.*, 2009; CONNOLLY *et al.*, 2015). Encontramos baixa positividade para a fosfatidilserina externalizada nas VE-BCG e VE-Meio, o que poderia levar à subestimação da quantidade de VE caso esse parâmetro fosse considerado para quantificação das VE em nosso trabalho. Em contraste, as VE-Plasma foram quase que em sua totalidade marcadas para anexina V (96,49%). Essa elevada positividade foi descrita por outros autores, estando relacionada a origem plaquetária dessas VE (CHRISTERSSON, JOHNELL e SIEGBAHN, 2013; CONNOLLY *et al.*, 2014). A baixa marcação por PI (menos de 1%) excluiu a possibilidade de contaminação do material por DNA/corpos necróticos.

Em seguida, buscamos avaliar a origem das VE em nossas preparações, verificando a expressão de anti-CD68, molécula encontrada na superfície de macrófagos, bem como de HLA-DR, responsável pela apresentação de antígenos. Mais da metade das VE apresentaram expressão de CD68, e entre as VE positivas para esse marcador observamos de 61 a 82% de expressão de HLA-DR, corroborando com um possível papel na apresentação de antígenos. A presença de HLA-DR na superfície de VE já foi relatada e tem sido associada ao seu papel pró-inflamatório (SCHNEIDER e SIMONS, 2013). Observamos que mais de 80% das VE-Plasma expressaram CD68, embora as VE-Plasma sejam descritas como derivadas de muitos tipos celulares, incluindo plaquetas, células endoteliais, leucócitos e eritrócitos. É possível que o CD68 seja encontrado na superfície de VE aliado a marcadores de outros tipos celulares. Serão realizados novos ensaios, com diferentes marcadores, para caracterizar melhor a composição das nossas preparações de VE, sobretudo as VE-Plasma.

Considerando que a transferência do seu conteúdo interno para células receptoras é uma das características mais descritas das VE (RAMACHANDRAN e PALANISAMY, 2012), avaliamos a presença das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF intravesiculares em nossas preparações. As citocinas podem ser liberadas predominantemente em forma solúvel ou associada a VE, dependendo do sistema biológico. O padrão de encapsulamento pode ser alterado após estimulação, sugerindo que o encapsulamento de citocinas em VE não é simplesmente a propriedade de uma citocina específica, mas sim um processo biológico rígido. A compartimentalização de citocinas encapsuladas em VE não é revelada pelos ensaios tradicionais (que quantificam as citocinas solúveis), e pode desempenhar um papel significativo na saúde e na doença. VE portadoras de citocinas são biologicamente ativas ao interagir com células sensíveis, podendo desencadear respostas pró-inflamatórias. (FITZGERALD *et al.*, 2018). Encontramos níveis aumentados das citocinas IL-6 e IL-8 nas VE-BCG, enquanto que níveis mínimos de TNF foram detectados nos três grupos de VE (obtidas após cultivo e do plasma). Não foram detectadas IL-1 β ou IL-10. IL-6 e IL-8 são citocinas pró-inflamatórias que estão relacionadas a uma série de funções fisiológicas, além de promoverem a migração coordenada e direcional de células do sistema imune (KLAFKE e ALEGRE, 2015).

A presença de citocinas internas e a expressão de HLA-DR sugerem que nossas VE possam desempenhar a função pró-inflamatória. Para avaliar essa possível função, quantificamos a produção de citocinas em culturas de macrófagos humanos infectados ou não por BCG tratadas com 50 μ g/ml de VE. Foram dosadas as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF e IL-8. Observamos a elevação nos níveis de todas as citocinas, exceto IL-8, após a infecção, independentemente do tratamento das células infectadas com VE. Entre as células não infectadas, encontramos que o tratamento com VE-Meio e VE-BCG aumentou a produção de IL-8 pelos macrófagos. Outros estudos de estimulação de macrófagos com VE derivadas de micobactérias ou de células infectadas com micobactérias relataram o aumento da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias: VE isoladas de macrófagos infectados por micobactérias induziram a liberação de TNF, IL-8, MIP-1 α e MCP-1 (WALTERS *et al.*, 2013); VE de neutrófilos infectados por MTB induziram a liberação de TNF, IL-6 e IL-10 (ALVAREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2018); e VE isoladas de cultura de micobactérias induziram a produção de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF, CXCL1 e MIP-1 α / CCL3

(PRADOS-ROSALES *et al.*, 2011). Esses estudos foram realizados utilizando cinéticas de isolamento de no máximo 3 dias, além de estímulos, origem e concentração de VE para tratamento diferentes das que usamos, o que pode interferir no perfil de ativação das células. A mudança no perfil de ativação das células (inclusive monócitos e macrófagos) leva a mudança no padrão de expressão de citocinas nas VE, podendo gerar diferentes respostas quando usadas para estimulação de células (FITZGERALD *et al.*, 2018). Pretendemos explorar o nosso modelo para compreender melhor a influência dessas divergentes condições de cultivo na capacidade estimulatória de VE.

Pretendemos avaliar a atividade antimicobacteriana de macrófagos após o tratamento com VE. Em um experimento piloto realizado em triplicata observamos uma redução de aproximadamente um terço da carga bacilar intracelular nos macrófagos que foram tratados com VE-BCG e VE-Plasma. A redução da carga bacilar intracelular foi relatada anteriormente em um trabalho em que macrófagos foram tratados com VE derivadas de neutrófilos infectados por MTB (ALVAREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2018).

Sumarizando os nossos resultados, obtivemos VE de macrófagos humanos tanto em condições fisiológicas quanto por infecção com BCG. A infecção elevou a quantidade de VE liberadas. Obtivemos também VE isoladas do plasma. Não foram observadas diferenças morfológicas nas preparações de VE nem tamanho médio para nenhum dos grupos avaliados, entretanto as VE-Plasma possuíam 3 vezes mais partículas por mL que VE-Meio e VE-BCG nas mesmas concentrações de proteínas. Demonstramos externalização de fosfatidilserina, presença de CD68 e expressão de HLA-DR em todos os grupos de VE, sugerindo um potencial papel pró-inflamatório. Ao nosso melhor conhecimento, este foi o primeiro trabalho que demonstrou que VE isoladas de macrófagos infectados por BCG carregam citocinas internamente. A IL-6 e IL-8 compartimentalizadas nessas vesículas podem favorecer a estimulação de células receptoras, bem como o aumento da atividade antimicobacteriana de macrófagos infectados, embora não tenhamos encontrado diferenças na produção de citocinas por macrófagos tratados com VE.

Com o decorrer do trabalho, encontramos dificuldades para repetir alguns ensaios, entre eles a avaliação da cinética de infecção, a atividade antimicobacteriana

e o NTA. Para a publicação, pretendemos repetir esses ensaios, além de caracterizar as VE com uma gama maior de marcadores. Pretendemos também refazer o ensaio do efeito imunoestimulador de VE utilizando uma nova cinética. Outras perspectivas incluem demonstrar a existência ou não de antígenos micobacterianos nas VE, e avaliar seu efeito na migração e adesão celular após o estímulo.

8. CONCLUSÃO

Macrófagos infectados pelo BCG (cepa vacinal Moreau-RJ) são capazes de liberar VEs que carregam moléculas de superfície do macrófago. Essas VEs têm potencial pró-inflamatório por expressarem HLA-DR e apresentarem níveis detectáveis de citocinas pró-inflamatórias no seu interior. Nossos dados sugerem uma possível atividade microbicida.

REFERÊNCIAS

- ABCAM. **Extracellular vesicles: an introduction**. Disponível em: <https://www.abcam.com/primary-antibodies/extracellular-vesicles-an-introduction>. Acesso em: 30 jul. 2018.
- AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical and Developmental Immunology**, DOI: 10.1155/2011/814943, 2011.
- ALVAREZ-JIMÉNEZ, V. D. *et al.* Extracellular vesicles released from mycobacterium tuberculosis-infected neutrophils promote macrophage autophagy and decrease intracellular mycobacterial survival. **Frontiers in Immunology**, v. 9, DOI: 10.3389/fimmu.2018.0027219, fev. 2018.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00491, 7 out. 2014.
- ATHMAN, J. J. *et al.* Bacterial membrane vesicles mediate the release of Mycobacterium tuberculosis lipoglycans and lipoproteins from infected macrophages. **Journal of Immunology, Baltimore**, v. 195, n. 3, p. 1044–1053, 1 ago. 2015.
- BAÑULS, A.-L. *et al.* Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1261–1269, 2015.
- BEAN, A. G. *et al.* Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **Journal of Immunology, Baltimore**, v. 162, n. 6, p. 3504–3511, 15 mar. 1999.
- BEAUVILLAIN, C. *et al.* A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 14-15, p. 1614–1622. dez. 2007.
- BEHAR, S. *et al.* Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 279–287, maio 2011.
- BERNIMOULIN, M. *et al.* Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 6, p. 1019–1028, jun. 2009.
- BHATNAGAR, S. *et al.* Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3234–3244. 1 nov. 2007.
- BRADFUTE, S. B. *et al.* Autophagy as an immune effector against tuberculosis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 355–365, jun. 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Boletim Epidemiológico - Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas**. Ministério da Saúde.

Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/26/2018-009.pdf>>.

Acesso em: 30 jul. 2017.

CABY, M.-P. *et al.* Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International Immunology**, v. 17, n. 7, p. 879–887. jul. 2005.

CALMETTE, A. La Vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG". **Masson et cie**, v. 18, p. 1075, 1927.

CAMBIER, C. J.; FALKOW, S.; RAMAKRISHNAN, L. Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, v. 159, n. 7, p. 1497–1509, 18 dez. 2014.

CARROLL, K. C. *et al.* *Mycobacteria*. In: JAWETZ, MELNICK. **Adelberg's Medical Microbiology**. 27. ed. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2015.

CARTER, D. J. *et al.* The impact of social protection and poverty elimination on global tuberculosis incidence: a statistical modelling analysis of Sustainable Development Goal 1. **The Lancet. Global Health**, v. 6, n. 5, p. e514–e522, 23 mar. 2018.

CHAPUT, N. *et al.* Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 3, p. 471–478 set. 2006.

CHARGAFF, E.; WEST, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 166, n. 1, p. 189–197, nov. 1946.

CHEN, L. *et al.* Therapeutic effects of serum extracellular vesicles in liver fibrosis. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1461-1505, 17 abr. 2018.

CHENG, Y.; SCHOREY, J. S. Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 12, p. 3279–3290, dez. 2013.

CHOI, D.-S. *et al.* Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. **Proteomics**, v. 13, n. 10-11, p. 1554–1571, maio. 2013.

CHRISTERSSON, C.; JOHNNELL, M.; SIEGBAHN, A. Evaluation of microparticles in whole blood by multicolour flow cytometry assay. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 73, n. 3, p. 229–239, 1 abr. 2013.

CONNOLLY, K. D. *et al.* Lipoprotein-apheresis reduces circulating microparticles in individuals with familial hypercholesterolemia. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 10, p. 2064–2072, out. 2014.

CORRADO, C. *et al.* Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: Basic science and clinical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5338–5366, 6 mar. 2013.

CRONEMBERGER-ANDRADE, A. *et al.* Extracellular vesicles from leishmania-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naïve macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, set. 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0003161.

DEL CACHO, E. *et al.* Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. **Vaccine**, v. 29, n. 21, p. 3818–3825, 12 maio. 2011.

DRAGOVIC, R. A. *et al.* Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine**, v. 7, n. 6, p. 780–788, dez. 2011.

DUARTE, T. A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation. **Tuberculosis, Edinburgh**, v. 92, n. 3, p. 218–225, maio. 2012.

EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. The granuloma in tuberculosis: Dynamics of a host–pathogen collusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, doi: 10.3389/fimmu.2012.00411 jan. 2013.

ENDERLE, D. *et al.* Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, doi: 10.1371/journal.pone.0136133, 28 ago. 2015.

FERRAZ, J. C. *et al.* Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1387–1397, nov. 2006.

FINE, P. E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. **Lancet, London**, v. 346, n. 8986, p. 1339–1345, 18 nov. 1995.

FITZGERALD, W. *et al.* A system of cytokines encapsulated in extracellular vesicles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8973, 12 jun. 2018.

FLYNN, J. L. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, v. 2, n. 6, p. 561–572, jun. 1995.

GERALDES SANTOS, M. DE L. S. *et al.* Poverty: socioeconomic characterization at tuberculosis. **Revista Latino-Americana De Enfermagem**, v. 15, p. 762–767, out. 2007.

GUALERZI, A. *et al.* Raman spectroscopy uncovers biochemical tissue-related features of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9820, 29 ago. 2017.

GUIRADO, E.; SCHLESINGER, L. S.; KAPLAN, G. Macrophages in tuberculosis: Friend or foe. **Seminars in immunopathology**, v. 35, n. 5, p. 563–583, set. 2013.

HÖÖG, J. L.; LÖTVALL, J. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, nov. 2015. doi: 10.3402/jev.v4.28680,.

HOSSAIN, M. M.; NORAZMI, M.-N. Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection—The double-edged sword? **BioMed Research International**, v. 2013. doi: 10.1155/2013/179174, 2013.

IWAI, K. *et al.* Isolation of extracellular vesicles in saliva using density gradient ultracentrifugation. **Methods in Molecular Biology, Clifton**, v. 1660, p. 343–350, 2017.

KADIU, I. *et al.* Biochemical and biologic characterization of exosomes and microvesicles as facilitators of HIV-1 infection in macrophages. **Journal of immunology, Baltimore**, v. 189, n. 2, p. 744–754, 15 jul. 2012.

KARIMI, N. *et al.* Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 75, n. 15, p. 2873–2886, ago. 2018.

KELLER, S. *et al.* Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 86, 2011.

KONADU, K. A. *et al.* Association of cytokines with exosomes in the plasma of HIV-1-seropositive individuals. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 11, p. 1712–1716, 1 jun. 2015.

LIU, J. *et al.* BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. **Human Vaccines**, v. 5, n. 2, p. 70–78, fev. 2009.

LYADOVA, I. V.; PANTELEEV, A. V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers. **Mediators of Inflammation**, 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/854507/>. Acesso em: 1 ago. 2018.

MERCHANT, M. L. *et al.* Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery. **Nature reviews. Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 731–749, dez. 2017.

MORRIS, M. D. *et al.* Social, economic, and psychological impacts of MDR-TB treatment in Tijuana, Mexico: A patient's perspective. **The international journal of tuberculosis and lung disease**, v. 17, n. 7, p. 954–960, jul. 2013.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global tuberculosis report 2017**. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em: 20 de junho de 2018.

ONNOLLY, K. D. *et al.* Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre- and post-adipogenesis. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, nov. 2015. doi: 10.3402/jev.v4.29159,

OROZCO, A. F.; LEWIS, D. E. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma., **Cytometry. Part A**, v. 77, n. 6, p. 502–514, jun. 2010.

OTTENHOFF, T. H.; KUMARARATNE, D.; CASANOVA, J. L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunology Today**, v. 19, n. 11, p. 491–494, nov. 1998.

PAI, M. *et al.* Tuberculosis. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 2, p. 16076, 27 out. 2016.

POLIAKOV, A. *et al.* Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. **The Prostate**, v. 69, n. 2, p. 159–167, 1 fev. 2009.

PRADOS-ROSALES, R. *et al.* Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 4, p. 1471–1483, 1 abr. 2011.

RAMACHANDRA, L. *et al.* Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5116–5125, dez. 2010.

RAMACHANDRAN, S.; PALANISAMY, V. Horizontal transfer of RNAs: Exosomes as mediators of intercellular communication. **Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA**, v. 3, n. 2, p. 286–293, mar. 2012.

RÍOS-BARRERA, V. A. *et al.* Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 345–353, 1 fev. 2006.

RUTTER, B. D.; INNES, R. W. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 728–741, jan. 2017.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 374–380, ago. 2005.

SANTOS, M. De L. S. G. *et al.* Poverty: socioeconomic characterization at tuberculosis. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. SPE, p. 762–767, out. 2007.

SCHNEIDER, A.; SIMONS, M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. **Cell and Tissue Research**, v. 352, n. 1, p. 33–47, abr. 2013.

SCHNITZER, J. K. *et al.* Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. **Vaccine**, v. 28, n. 36, p. 5785–5793, 16 ago. 2010.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews. Immunology**, v. 9, n. 8, p. 581–593, ago. 2009.

TKACH, M.; THÉRY, C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1226–1232, 10 mar. 2016.

TORREGROSA PAREDES, P. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. **Allergy**, v. 67, n. 7, p. 911–919, jul. 2012.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 251–276, 1995.

TRIPISCIANO, C. *et al.* Different potential of extracellular vesicles to support thrombin generation: Contributions of phosphatidylserine, tissue factor, and cellular origin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6522, 26 jul. 2017.

WALTERS, S. B. *et al.* Microparticles from *Mycobacteria*-infected macrophages promote inflammation and cellular migration. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 669–677, 15 jan. 2013.

WHITESIDE, T. L. The emerging role of plasma exosomes in diagnosis, prognosis and therapies of patients with cancer. **Contemporary Oncology**, v. 22, n. 1A, p. 38–40, mar. 2018.

XU, G. *et al.* Insights into battles between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages. **Protein & Cell**, v. 5, n. 10, p. 728–736, out. 2014.

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, doi: 10.3402/jev.v4.27066, 14 maio. 2015.

YANG, S.; LI, X. Recent advances in extracellular vesicles enriched with non-coding RNAs related to cancers. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 1, p. 36–42, 1 mar. 2018.

ZWERLING, A. *et al.* The BCG world atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. **PLoS medicine**, v. 8, n. 3, p. e1001012, mar. 2011.